

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin
Abteilung für Kardiologie
Stiftung des Bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Rolle von Cardiotrophin-1 für die Pathogenese von Kardiomyopathien: Genetische Variabilität und Regulation der Expression im menschlichen Myokard

Zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinische Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von
Sabine Haßfeld

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Regitz-Zagrosek
2. Prof. Dr. med. J. Holtz
3. PD Dr. med. G. Nickenig

eingereicht: 04.07.2003
Datum der Promotion: 23.04.2004

Abstrakt

Cardiotrophin-1 ist ein Zytokin der Familie Interleukin-6-Familie, zu der auch IL-11, CNTF, OSM und LIF gehören. Diese Substanzen wirken über die gemeinsame Rezeptoruntereinheit gp130.

CT-1 induziert die Hypertrophie von Kardiomyozyten und inhibiert die Apoptose kardialer Zellen. In verschiedenen Tiermodellen der Herzinsuffizienz konnte eine gesteigerte myokardiale CT-1 Expression beobachtet werden.

Kardiomyopathien sind wiederum kardiale Erkrankungen, die mit einer Hypertrophie und Apoptose einhergehen und zu einer Herzinsuffizienz führen können. Man geht davon aus, dass 25-50 Prozent der familiär sind. Hierbei handelt es sich um eine monogenetische Erkrankung, die überwiegend autosomal-dominant vererbt werden. Daneben konnten aber auch modifizierende Polymorphismen in neurohumoralen Faktoren identifiziert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen war das Ziel dieser Arbeit die Analyse der möglichen Beteiligung genetischer Varianten der kodierenden sowie der regulatorischen Region an der Pathogenese der Hypertrophie bzw. Dilatativen Kardiomyopathie. Zusätzlich sollte die mRNA-Expression von CT-1 in Myokardbiopsien von Patienten mit Herzinsuffizienz quantifiziert werden.

Hierfür musste zunächst die Sequenzen der 5'-flankierenden Region identifiziert und bezüglich ihrer regulatorischen Eigenschaften analysiert werden. Es konnten 1,1 kb der 5'-flankierenden Region sequenziert werden. Die anschließende Luciferase-Reportergen-Analyse wies regulatorische Aktivitäten für den gesamten Bereich nach. Diese Region enthält zahlreiche cis-aktive DANN-Sequenzen aber keine TATA-Box.

Für die Mutationssuche wurden 64 Patienten mit DCM, 53 Patienten mit HCM sowie 100 Kontrollpersonen mittels PCR-SSCP-Analyse untersucht. Es konnte eine kodierende Variante A92T bei jeweils einem DCM- bzw. HCM-Patienten identifiziert werden. Diese Substitution liegt in einem Bereich, der zwischen verschiedenen Spezies (Ratte, Maus, Mensch) konserviert ist. Diese Mutation könnte eine Veränderung der Sekundärstruktur bewirken und liegt in einem möglichen funktionellen Bereich.

Die Promotorregion wies eine Basenpaarsubstitution bei -130 (G/T) sowie eine Deletion der Basen CTTT zwischen -992 und -995 auf. Der Polymorphismus an Position -130 fand sich tendenziell häufiger bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie. Die CTTT-Deletion konnte nur bei einer Patientin mit HCM nachgewiesen werden.

Für die Quantifizierung der CT-1 mRNA wurden rechtsventrikuläre Endomyokardbiopsien von 6 Patienten mit eingeschränkter LVEF (CHI), 5 Patienten nach Herztransplantation (TX) sowie 3 Kontrollpatienten (KO) eingesetzt. Es konnte ein relativer Anstieg der CT-1 Expression um 82% bei den Patienten mit eingeschränkter LVEF festgestellt werden. Interessanterweise besteht eine enge Korrelation zur Schwere der eingeschränkten Herzfunktion sowie zur Zunahme der Hypertrophie.

Cardiotrophin-1, CT-1, Interleukin-6, IL-6, IL-11, LIF, CNTF, OSM, gp130, Hypertrophie, Apoptose, Herzinsuffizienz, Hypertrophe Kardiomyopathie, HCM, Dilatative Kardiomyopathie, DCM, Promotor, Mutation, mRNA-Expression, PCR, SSCP, Luciferase Reportergen Analyse, HPLC

Abstract

Cardiotrophin-1 is a cytokine, which belongs to the interleukin-6 family, which includes IL-11, CNTF, OSM and LIF. These factors act via the receptor subunit gp130.

CT-1 induces the hypertrophy of cardiomyocytes and inhibits the apoptosis of cardiac cells. Studies in animal models of congestive heart failure showed an enhanced expression of CT-1 in the myocardium.

Cardiomyopathies are cardiac disorders, which are characterized by hypertrophy and apoptosis and which can terminate with congestive heart failure. About 25-50 percent of all cases are familial. It is a monogenetic mendelian disorder with an autosomal-dominant inheritance in most cases. Beside this, modifying polymorphisms in neurohumoral factors could be identified.

Based on these facts, the aim of this study was to identify genetic variants within the coding and regulatory region of the CT-1 gene, which could influence the pathogenesis of hypertrophic or dilated cardiomyopathy. Additionally, the mRNA-expression of CT-1 in myocardial biopsies of heart failure patients should be quantified.

First, it was necessary to sequence the 5'-untranslated region and to analyse its regulatory function. We could sequence 1.1 kb of the 5'-UTR. The luciferase reporter gene assay showed a significant promoter activity for the whole region. The region contains various cis-active DNA sequences but no TATA-box. The TRANSFAC-analysis identified different binding sites for transcription factors but no TATA-box.

The genetic material of 64 DCM and 53 HCM patients and 100 controls was screened for mutations by using a PCR-based SSCP-analysis. A coding variant A92T could be identified for a patient with DCM and for an HCM patient. This mutation lies within a region which is conserved between different species (rat, mouse, human). This variant could disturb the secondary structure and lies in a probable functional region.

Within the promoter we could identify a basepair substitution at position -130 (G/T) and a 4-basepair deletion between -992 and -995 (CTTTdel). The polymorphism at -130 showed a tendency for a higher occurrence in DCM patients. One HCM patient was heterozygous for the CTTT-deletion.

To quantify the CT-1 mRNA we used endomyocardial biopsies of 6 patients with reduced LVEF (CHI), 5 patients after heart transplantation (TX) and 3 controls (KO). We performed a semiquantitative analysis by using HPLC and an external standard (PDH mRNA). We found an

increased expression of CT-1 by 82% for patients with heart failure. Interestingly, we saw a tight correlation with to the reduction in LV function and to the degree of hypertrophy.

cardiotrophin-1, CT-1, interleukin-6, IL-6, IL-11, LIF, CNTF, OSM, gp130, hypertrophy, apoptosis, heart failure, hypertrophic cardiomyopathy, HCM, dilated cardiomyopathy, DCM, promoter, muatation, mRNA-expression, PCR, SSCP, luciferase reportergene assay, HPLC

Publikationen:

Erdmann, J., S. Hassfeld, et al. (2000). "Genetic variants in the promoter (g983G>T) and coding region (A92T) of the human cardiotrophin-1 gene (CTF1) in patients with dilated cardiomyopathy." Hum Mut 16 (5): 448

Erdmann, J., Hassfeld, S. et al. (1998). "Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human Cardiotrophin-1 gene." Biochem and Biophys Res Comm 244: 494-497.

Kongressbeiträge:

47th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 1997, Baltimore, "Identification of a coding variant (Ala92Thr) in the human cardiotrophin-1 gene and cloning of the promoter" Am J Hum Genet, 1997, 61 (4), A332, Abstract (Nr. 1944)

10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 1998, Jena, „Cloning and characterization of the 5'flanking region of the human Cardiotrophin-1 gene (CT-1)“ Medizinische Genetik, 1998, 10 (1), Abstract P6C-5

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 1998, Mannheim, „Identifizierung und Charakterisierung von Varianten in der kodierenden Region und im Promotor des humanen Cardiotrophin-1 Gens“ sowie „Klonierung und Charakterisierung des Promotors des humanen Cardiotrophin-1 Gens“ Zeitschr Kardiol, 1998, 87 (I), 199, Abstract (Nr. 778) und 266, Abstract (Nr. 989)

American Heart Association 71th Scientific Session, 1998, Dallas "Cloning and characterization of the promoter of the human cardiotrophin-1 (CT-1) and identification of genetic variants in 208 patients with dilated cardiomyopathy" Circ, 1998, Nov (Suppl.), I-245, Abstract (Nr. 1274)

20th Congress of the European Society of Cardiology, 1998, Wien, "Identification and characterization of variants within the coding and the promoter region of the human cardiotrophin-1 gene" sowie "Cloning and characterization of the 5'flanking region of the human cardiotrophin-1 gene" Eur Heart J, 1998, 19 (Suppl.), 37, Abstract (Nr. P422) und 483 (Nr. 2754)

1 Einleitung

Kardiomyopathien sind primäre Myokarderkrankungen, die sich nicht als Folge koronarer Herzerkrankungen, Herzklappenvitien, pulmonaler bzw. systemischer Hypertonie oder Perikarderkrankungen entwickeln. Mit einer Mortalität von 5-15 % pro Jahr gehören Kardiomyopathien zu den prognostisch ungünstigen Herzerkrankungen. Dabei stellen die schwere Herzinsuffizienz und der plötzliche Herztod die Haupttodesursachen dar. Therapeutisch stehen nur die Mittel zur Behandlung von Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen und als ultima ratio die Herztransplantation zur Verfügung. Trotz einer relativ niedrigen Prävalenz von bis zu 36 Fällen pro 100.000 Einwohner zählt die Dilatative Kardiomyopathien zu den häufigsten Indikationen für eine Herztransplantation.

Für die beiden häufigsten Formen, die Dilatative (DCM) und die Hypertrophe (HCM) Kardiomyopathie wird eine genetische Beteiligung in ca. 20-30 % bzw. circa 100 % angenommen. Bisher konnte nur ein Teil der genetischen Ursachen aufgeklärt werden.

Dem Nachweis krankheitsverursachender Gene stehen die Kopplungs- und Kandidatengenuntersuchungen zur Verfügung. Mit Hilfe der Kopplungsanalyse wird in geeigneten Stammbäumen nach einer gemeinsamen Vererbung eines genetischen Markers und eines Krankheitsphänotyps gesucht. Als Marker dient ein genetischer Polymorphismus, dessen chromosomale Lokalisation bekannt ist. Ein positiver Kopplungsbefund gibt Aufschluß über die chromosomale Lage eines Krankheitsgens. Dieser Bereich muß anschließend durch Feinkartierung weiter eingegrenzt werden. Für diese Methode sind allerdings genügend große Familien mit mehreren betroffenen Patienten zur genetischen und klinischen Analyse erforderlich. Dies ist aufgrund früher Todesfälle, sporadischer Fälle und kleiner Familien häufig nicht möglich. Alternativ steht die Methode des Kandidatengenansatzes zur Verfügung. Für diese Untersuchungen wählt man Gene, die anhand bestehender Hypothesen an der Krankheitsentwicklung beteiligt sein könnten. Diese werden mit verschiedenen Methoden auf Sequenzvarianten hin untersucht, die aufgrund ihrer Häufigkeit, Veränderungen in der Proteinsequenz und funktioneller Domänen sowie der Kosegregation innerhalb betroffener Familien an der Verursachung der Erkrankung beteiligt sein könnten. Mutationsanalysen in Kandidatengen haben die Klonierung und Sequenzierung dieser Gene und die Identifizierung der genetischen Variabilität zur Voraussetzung. Für Ersteres leistete das "Humane-Genom-Projekt" einen wesentlichen Beitrag. Letzteres läßt sich für große Patientenkollektive mittels effizienter Methoden wie der SSCP-Analyse durchführen.

Für die Kardiomyopathien wären geeignete Kandidatengene solche, die einerseits für Proteine des Sarkomers und des Cytoskeletts, wie z.B. Dystrophin, β -Myosin, Troponin T und weitere kodieren. Andererseits wird eine Beteiligung von autokrinen und parakrinen Faktoren, wie z.B. das Renin-Angiotensin-System, Endothelin und Zytokinkaskaden (TNF- α , Interleukine, NO), an der Ätiologie und Pathogenese angenommen. Somit sind auch Gene, die für diese Faktoren sowie deren Rezeptoren kodieren, geeignete Kandidatengene. Zusätzlich sind auch die dazugehörigen Promotor- und Enhancer-Sequenzen von Interesse, da Sequenzänderungen in diesen Bereichen zu einer geänderten Expression führen können.

Unabhängig von möglichen genetisch determinierten Expressionsunterschieden sind Hormone und proinflammatorische Zytokine an der Entwicklung der Herzinsuffizienz beteiligt [Levine, 1990 Matsumori, 1994]. In diesem Zusammenhang erscheinen die Mitglieder der Interleukin-6-Familie, speziell das kürzlich entdeckte Cardiotrophin-1 [Pennica, 1995a] als besonders interessant, da es sowohl eine hypertrophe als auch eine antiapoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten aufweist.

1.1 Kardiomyopathien

1.1.1 WHO/ISFC-Klassifikation

Nach der 1995 aktualisierten und 1996 veröffentlichten WHO/ISFC-Klassifikation [Richardson, 1996] werden als Kardiomyopathien alle Erkrankungen des Herzmuskels bezeichnet, die mit einer objektivierbaren kardialen Funktionsstörung einhergehen.

Danach unterscheidet man die folgenden fünf Formen:

- 1.) Dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- 2.) Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)
- 3.) Restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- 4.) Arrhythmogene Rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVC)
- 5.) Nichtklassifizierbare Kardiomyopathien (NKCM)

Für die Zuordnung zu den Formen 1.-4. gelten primär hämodynamische Kriterien. Die überwiegende Beteiligung des linken Ventrikels bei der dilatativen, hypertrophen und restriktiven Kardiomyopathie und der eher rechtsventrikuläre Befall bei der ARVC werden ebenfalls berücksichtigt.

Eine der wesentlichen Erneuerungen dieser Klassifikation ist, daß der Begriff der Kardiomyopathien nicht mehr nur auf die ätiologisch nicht erklärbaren (=idiopathischen) Myokarderkrankungen beschränkt wird. Vielmehr werden jetzt auch sekundäre Formen einbezogen.

Die beiden häufigsten Formen sind die Dilatative und die Hypertrophe Kardiomyopathie. Da nur aus diesen beiden Gruppen die Patienten für die vorliegende Arbeit rekrutiert wurden, werden nachfolgend nur diese beiden Formen vorgestellt.

1.1.2 Dilatative Kardiomyopathie

Die Dilatative Kardiomyopathie ist durch eine biventrikuläre Dilatation mit einer Verminderung der linksventrikulären Funktion sowie einer Erhöhung des enddiastolischen Volumens gekennzeichnet. Männer sind bevorzugt betroffen (ca 2:1). Die Prävalenz liegt bei circa 36 pro 100.000 Einwohnern [Codd, 1989]. Die DCM gehört neben der Ischämischen Herzerkrankung zu den wichtigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz [Kaye, 1992].

Klinisch ist die Erkrankung im Wesentlichen durch eine fortschreitende Linksherzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen sowie thromboembolische Komplikationen gekennzeichnet.

Die Diagnose ist häufig eine Ausschlußdiagnose und beinhaltet auch invasive Methoden zur Abgrenzung gegenüber der Koronaren Herzerkrankung (KHK). Da die diagnostische Aussagekraft einer Myokardbiopsie unterschiedlich bewertet wird, gehört diese nicht zum Standard. Die Histologie ist unspezifisch und umfaßt Hypertrophie, interstitielle Fibrose sowie Endokardverdickungen. Hilfreich ist eine Biopsie bei Verdacht auf postmyokarditische Prozesse sowie zur Abklärung einer Amyloidose und anderer Speicherkrankheiten [Braunwald, 1997]. Patienten mit DCM haben eine schlechte Prognose, die umso ungünstiger wird, je beeinträchtigt die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zum Zeitpunkt der Diagnose ist. Neuere Studien [Sugrue, 1992] berichten über eine Mortalität von etwa 20% innerhalb von 5 Jahren.

Die Ätiologie ist in etwa der Hälfte der Fälle unbekannt. Man geht bei ca. 20-30 % von einer familiären Genese und bei circa einem Drittel der Fälle von einer Myokarditis durch Enteroviren aus. Weitere, seltenere Formen entwickeln sich im Rahmen von alkohol- und medikamententoxischen Schäden, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, Stoffwechsel- und endokrinen Erkrankungen, hyperergen Störungen, neuromuskulären Erkrankungen sowie Neoplasien.

Der Einfluß genetischer Faktoren auf die Ätiologie der DCM wird je nach Wahl des Patientenkollektivs unterschiedlich bewertet. Bei alleiniger systematischer Familienanamnese ergeben sich in 5-10 % der Fälle Hinweise auf einen genetischen Einfluß [**Mestroni, 1990**]. Studien, die alle verfügbaren Familienmitglieder eines Indexpatienten systematisch klinisch, elektro- und echokardiographisch untersuchten, konnten einen Anteil von 20-35 % an familiären Formen nachweisen [**Grunig, 1998; Michels, 1992**]. Baig et al [**Baig, 1998**] gingen sogar von bis zu 48 % aus, wenn auch Familienmitglieder mit vergrößertem linken Ventrikel aber ohne eingeschränkte Ejektionsfraktion eingeschlossen werden.

In der Mehrzahl der Fälle liegt ein autosomal-dominanter Erbgang vor [**Michels, 1992**]. Hierfür wurden bisher insgesamt sechzehn Genloci identifiziert. Diese, sowie die bisher identifizierten dazugehörigen Gene, sind in der Tabelle 1 dargestellt. Neben autosomal-dominanten sind auch X-chromosomal dominante Erbgänge sowie seltenere X-chromosomal-rezessive Fälle beschrieben. Sehr viel seltener lassen sich autosomal-rezessive Formen [**Kelly, 1994**] oder ein Zusammenhang mit Mutationen im mitochondrialen Genom [**Suomalainen, 1992**] finden. Erstere können durch Mutationen in verschiedenen Genen der Fettsäureoxidation verursacht werden. Am bekanntesten sind hierbei Carnitinstoffwechselstörungen. Autosomal-rezessive und mitochondrial bedingte Kardiomyopathien manifestieren sich bevorzugt schon im Kindesalter.

Tab. 1: Bekannte genetische Ursachen der Dilatativen Kardiomyopathie

Genlocus	Zusätzlicher Phänotyp	Krankheitsgen	Erstbeschreibungen
1q32	keiner	Kardiales Troponin T	[Durand, 1995]
2q11-q22	keiner	unbekannt	[Jung, 1999]
2q31	keiner	Titin	[Siu, 1999]; [Gerull, 2002]
5q33-q34	keiner	δ-Sarcoglycan	[Tsubata, 2000]
6q12-q15	keiner	unbekannt	[Sylvius, 2001]
9q13-q22	keiner	unbekannt	[Krajinovic, 1995]
14q11	keiner	Kardiales β-MHC	[Kamisago, 2000]
15q14	keiner	Kardiales Aktin	[Olson, 1998]
15q2	keiner	α-Tropomyosin	[Olson, 2001]
10q21-q23	Mitralklappenprolaps	unbekannt	[Bowles, 1996]
1q1-q21	Leitungsstörungen	Lamin A/C	[Kass, 1994]; [Fatkin, 1999]
3q22-p25	Leitungsstörungen	unbekannt	[Olson, 1996]
19q13.2	Leitungsstörungen	unbekannt	[de Meeus, 1995]
2q35	Skelettmyopathie	Desmin	[Li, 1999]
6q23	Skelettmyopathie	unbekannt	[Messina, 1997]
6q23-24	Sensorineuraler Hörverlust	EYA4 (Transkriptionsfaktor)	[Schonberger, 2000]
Xp21	Skelettmuskelmyopathie	Dystrophin	[Franz, 1995]
Xq28	Minderwuchs, Neutropenie	Tafazzin	[D'Adamo, 1997]

1.1.3 Hypertrophe Kardiomyopathie

Bei der Hypertrophen Kardiomyopathie handelt es sich hämodynamisch überwiegend um eine gestörte Compliance der stark hypertrophierten Kammerwände, einhergehend mit erhöhten linksventrikulären Füllungsdrücken. Die WHO-Klassifikation unterscheidet eine nichtobstruktive (HNCM) und eine obstruktive (HOCM) Form. Letztere ist durch eine asymmetrische Septumhypertrophie mit einer Obstruktion des linksventrikulären Ausflusstraktes gekennzeichnet. Ungefähr dreiviertel der Fälle weisen die nichtobstruktive Form auf. Mit einer Prävalenz von 19,7 je 100.000 Einwohnern ist die HCM insgesamt seltener als die DCM. Auch diese Form der Kardiomyopathie betrifft bevorzugt Männer (ca. 2:1) [Maron, 1995].

Die Patienten sind häufig beschwerdefrei oder klagen über Dyspnoe, Angina pectoris-Anfälle, Synkopen und Herzrhythmusstörungen. Letztere stellen eine besondere Gefahr dar, da sie zum plötzlichen Herztod führen können. Bei einer frühzeitigen Diagnosestellung und Risikoevaluierung kann ein Implantierbarer Cardioverter Defibrillator (ICD) diese Komplikation verhindern. Die Diagnose läßt sich überwiegend echokardiographisch stellen.

Histologisch zeigen sich eine Hypertrophie mit einem Strukturverlust von Myozyten und Myofibrillen mit Vermehrung der Mitochondrien, eine interstitielle Fibrose, ein Verlust der Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen sowie Intimaverdickungen intramuraler Koronararterien. [Braunwald, 1997].

Da sich in der Familienanamnese häufig Hinweise auf ähnliche Herzerkrankungen oder Symptome finden lassen, geht man davon aus, daß fast 100% der Erkrankungen genetisch bedingt sind. Bisher ließen sich Mutationen in 11 Genen nachweisen, die vermutlich für circa 50% der Fälle verantwortlich sind (siehe Tab 2.). Die Vererbung erfolgt autosomal-dominant. Allerdings ist die Penetranz, das heißt die Tendenz zur Ausprägung der Erkrankung, insbesondere bei Kindern unvollständig. Bei Erwachsenen ist sie deutlich höher und kann in einigen Familien 100 % betragen. Daneben wurden aber auch asymptomatische Patienten mit sicherem Überträgerstatus identifiziert. Die Ursachen dafür könnten in Umweltfaktoren aber auch in modifizierenden genetischen Komponenten, wie z.B. Polymorphismen in weiteren Genen, zu finden sein [Vosberg, 1998]. Nach dem heutigen Kenntnisstand geht man am ehesten von einer dominant negativen Wirkung der veränderten Proteine aus. Hierbei besteht der Kontraktionsapparat aus normalen sowie dysfunktionalen Proteinen. Die mutierten Proteine verursachen in diesem Fall eine Fehlfunktion des gesamten Proteinkomplexes. Bei Verwendung rekombinanter mutierter und normaler Myosinfragmente wurden in Motilitätsversuchen zum Beispiel veränderte Kontraktions- und Motilitätseigenschaften beobachtet [Lankford, 1995].

Tab. 2: Bekannte Gene und Genorte der Hypertrophen Kardiomyopathie

Chromosomale Lokalisation	Gen	Anteil an bekannten Loci	Identifizierte Mutationen
1q3	Troponin T	15-20 %	> 20
2q31	Titin	?	?
3p21.2-3p21.3	Essentielle Myosin-Leichtkette (ELC)	< 1 %	2
7q3	Gamma(2)-Untereinheit der AMP-aktivierten Protein-Kinase	?	1
11p11	Myosin-Bindungsprotein C	15-20 %	> 15
12q23-q24.3	Regulatorische Myosin-Leichtkette (RLC)	< 1 %	2
14q1	β -Myosin-Schwerkette (MHC)	35-50 %	> 50
15q11	kardiales Aktin	?	?
15q2	Tropomyosin	< 5 %	3
19q13	Troponin I	< 1 %	3

Bisher konnten zwar einige Ursachen der HCM sowie der DCM aber nicht die weitergehenden pathogenetischen Mechanismen, die die Ausbildung des Phänotyps steuern, identifiziert werden. Schwere Beeinträchtigungen des Kontraktionsapparates würden eine frühere Krankheitsmanifestation erwarten lassen. Deshalb ist es wahrscheinlicher, daß leichtere Störungen des Kontraktionsablaufes nach einem längeren Zeitraum zu sekundären Veränderungen führen, durch die die symptomatischen Funktionseinschränkungen bedingt werden. Hierbei sind vermutlich die gestörte Anordnung der kontraktile Filamente und der Zellen selbst primär pathogenetisch relevant, da davon die Koordination der Kontraktion und die Erregungsausbreitung betroffen sein könnten. In diesem Prozeß stellt die Hypertrophie eher einen Kompensationsmechanismus zum Ausgleich von Funktionsdefiziten dar. Hierbei ist neben den primären krankheitsverursachenden Mutationen eine Beteiligung von genetisch determinierten Varianten von Faktoren pathogenetisch relevanter Stoffwechselwege denkbar. Diese könnten die Ausprägung des Phänotyps beeinflussen beziehungsweise das Risiko der Manifestation der Erkrankung erhöhen. Kandidaten für diese modifizierenden Faktoren (sogenannte „modifier genes“) sind Gene, die für Proteine aller hypertrophie-assoziierten Stoffwechselwege kodieren. So führte z.B. die ventrikelspezifische Inaktivierung der gemeinsamen Rezeptoruntereinheit gp130 der IL-6-Zytokinfamilie zur Entwicklung einer Ventrikeldilatation bei Druckbelastung. Kontrollherzen zeigten dagegen eine kompensatorische Hypertrophie [Hirota, 1999].

Wir stellten daher die Hypothese auf, daß Varianten im humanen Cardiotrophin-1 (CT-1) Gen, einem Zytokin der IL-6 Familie, die Manifestation von Kardiomyopathien beeinflussen, da CT-1 an der Regulation des myokardialen Wachstums beteiligt ist.

1.2 Cardiotrophin-1 und die Interleukin-6-Familie

1.2.1 Protein- und Genstruktur, Chromosomenlokalisierung und Einordnung von Cardiotrophin-1

Pluripotente embryonale Stammzellen der Maus differenzieren unter bestimmten Bedingungen in mehrzellige zystische embryonale Körper, die kardiale Marker aufweisen und spontan anfangen, zu schlagen. Aus diesem Grunde wurden sie auf ihre Fähigkeit hin untersucht, als Quelle für neue hypertrophie-induzierende Faktoren zu dienen. In der Tat führt das konditionierte Medium dieses Ansatzes zur Hypertrophie neonataler Kardiomyozyten. Mit Hilfe dieses Assays isolierten Pennica et al. das Gen eines neuen Proteins, das sie Cardiotrophin-1 nannten [Pennica, 1995a].

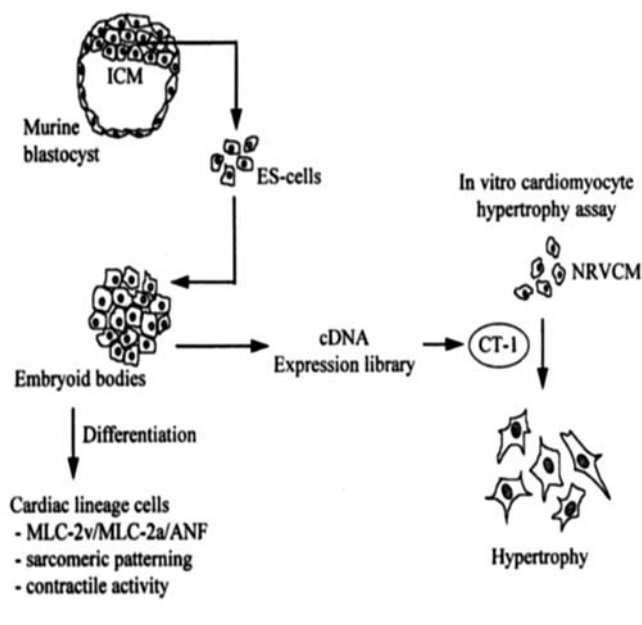


Abb. 1: Prinzip der Expressions-Klonierung, das zur Identifizierung von Cardiotrophin-1 führte, ICM= innere Zellmasse, ES-cells= Embryonale Stammzellen, MLC-2v/a= ventrikuläre/atriale Myosin-Leichtkette-2, ANF= Atrialer natriuretischer Faktor, NRVM= neonatale Ratten Ventrikelkardiomyozyten [Wollert, 1997]

Das menschliche Cardiotrophin-1-Gen besteht aus drei Exons, deren kodierende Sequenzen insgesamt 606 bp umfassen. Durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisation konnte es auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 in der Region 16p11-q13 lokalisiert werden. Das entsprechende 201 Aminosäuren (AS) lange Protein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa und ist zu 80% identisch zum entsprechenden Protein der Maus. Menschliches CT-1 enthält einen Zysteinrest und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle, besitzt aber keine hydrophoben N-terminalen Sequenzen, die als Sekretionssignal dienen könnten [Pennica, 1996b]. Dieses Phänomen konnte schon bei verschiedenen sezernierten Proteinen beobachtet werden. Einige benutzen interne hydrophobe Sequenzen, bei anderen wird ein alternativer Sezernierungsweg angenommen [Muesch, 1990].

Sequenzvergleiche wiesen Homologien zu den Zytokinen der Interleukin-6-Familie auf. Zu dieser Gruppe gehören Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Leukemie Inhibitionsfaktor (LIF), Oncostatin M (OSM) und Ciliarer Neurotropher Faktor (CNTF). CT-1 ähnelt LIF und CNTF zu circa 24% respektive 19%. Obwohl auch die anderen Mitglieder der IL-6-Familie nur 15-20%ige Sequenzhomologien aufweisen, werden sie aufgrund ihrer ähnlichen Tertiärstruktur als eine Gruppe zusammengefaßt. Dabei geht man von einer Struktur aus, die vier amphipathische Helices enthält. Diese Struktur kann auch für CT-1 vorausgesagt werden [Pennica, 1995a].

Darüber hinaus binden alle IL-6-Zytokine unter anderem an die gleiche Rezeptoruntereinheit, das Glykoprotein 130 (gp130). Daraus ergeben sich überlappende Funktionen in verschiedenen Geweben.

1.2.2 Expressionsmuster von Cardiotrophin-1

CT-1 wird in zahlreichen menschlichen Geweben in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. Besonders hohe mRNA-Spiegel wurden in Herz, Skelettmuskulatur, Prostata und Ovarien nachgewiesen. Gewebe von Lungen, Nieren, Pankreas, Thymus, Testis und Dünndarm zeigten eine geringere CT-1-Expression. In Gehirn, Plazenta, Leber, Milz, Colon und zirkulierenden Leukozyten konnten keine oder nur geringe mRNA-Mengen detektiert werden. Fetales Lungen- und Nierengewebe wies eine starke CT-1-Expression auf (Abb.2) [Pennica, 1996b].

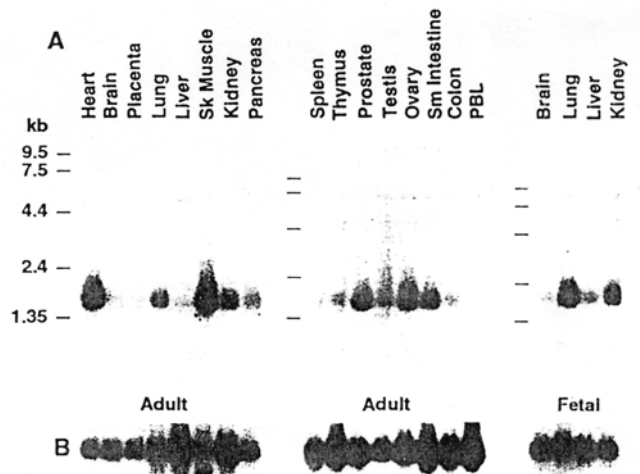


Abb. 2: mRNA-Expressionsmuster von CT-1 in verschiedenen humanen Geweben. A: Hybridisierung mit CT-1-Probe, B: Rehybridisierung derselben Blots mit einer Aktin-Probe (aus **Pennica, 1996b**)

Während der Embryogenese der Maus zeigt Cardiotrophin ein zeitlich variierendes Expressionsverhalten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium wichtiger Organsysteme. Es ist zuerst hauptsächlich im sich entwickelnden Herz nachweisbar, das auch während der weiteren Embryogenese einer der wichtigsten Expressionsorte bleibt [**Sheng, 1996**]. Später finden sich auch hohe mRNA-Spiegel in anderen Organanlagen, wie z.B. den Extremitäten und dem Skelett [**Pennica, 1996a**]. Cardiotrophin scheint daher an der Entwicklung verschiedener Gewebe insbesondere des kardialen beteiligt zu sein. Da das Herz bis ins Erwachsenenstadium einer der Hauptbildungsorte für dieses Zytokin bleibt, scheint es auch postnatal für dessen Funktion von Bedeutung zu sein. Kürzlich konnten Asai et al. zeigen, daß das menschliche Herz Cardiotrophin über den Koronarsinus in die periphere Zirkulation sezerniert [**Asai, 2000**].

1.2.3 Rezeptorsysteme und Signaltransduktionswege der Interleukin-6-Familie

Zytokine der IL-6 Familie binden an Komplexe aus verschiedenen Rezeptoruntereinheiten. Diese gehören zu den Zytokinrezeptoren der Klasse I. Die gemeinsame Untereinheit ist das Glykoprotein 130 (gp130), das auch hauptsächlich an der Signaltransduktion beteiligt ist [**Taga, 1997**]. Mehrere Studien mit monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Epitope von gp130 zeigten das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen für einzelne Mitglieder der IL-6-Familie mit agonistischen und antagonistischen Eigenschaften [**Wijdenes, 1995; Chevalier, 1996; Liautard, 1997; Timmermann, 2000**].

Neben gp130 sind zusätzliche zytokinspezifische Untereinheiten an der Bildung des Rezeptorkomplexes beteiligt. Interleukin-6 und IL-11 binden an den IL-6- respektive IL-11-

Rezeptor (IL-6R, IL-11R) und induzieren dadurch die Homodimerisation zweier gp130-Moleküle.

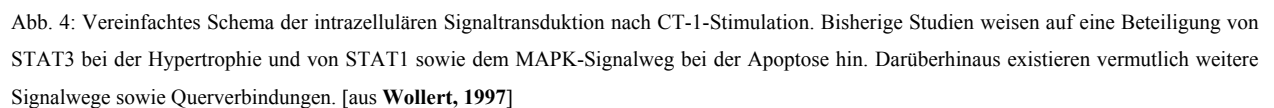
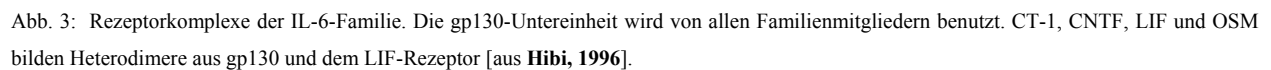
Die übrigen Familienmitglieder LIF, CNTF, OSM und CT-1 verursachen die Heterodimerisation von gp130 mit dem LIF-Rezeptor. Für OSM konnte inzwischen ein zweiter Rezeptor kloniert werden [Mosley, 1996]. Je nach Gewebe bindet OSM entweder an den Rezeptor Typ I (gp130/LIF-R) oder Typ II (gp130/OSM-R). Für CT-1 wurde von Robledo et al. ebenfalls die Existenz einer zusätzlichen Rezeptoruntereinheit beschrieben, bei der es sich um ein stark glykosyliertes Protein von 80 kDa Molekulargewicht handelt (gp80). Diese Untereinheit scheint aber nicht für die Bildung des hochaffinen Rezeptors notwendig zu sein, da sie sich erst nach der Heterodimerisation von gp130 und LIF-R an den Komplex anlagert. Es wird vermutet, daß gp80 die Zellspezifität und -sensitivität für CT-1 reguliert. Die Tatsache, daß sich gp80 nicht in allen Geweben, die LIF-R exprimieren, nachweisen läßt, unterstützt diese Hypothese [Robledo, 1997]. (Abb.3)

Die Rezeptoruntereinheit gp130 besitzt keine eigenständige Tyrosinkinaseaktivität und ist daher mit cytoplasmatischen Tyrosinkinasen, hier hauptsächlich der Familie der Januskinasen (JAK), assoziiert. Die einzelnen Mitglieder JAK1, JAK2 und Tyk2 werden jeweils zell- und zytokinspezifisch aktiviert und phosphorylieren ihrerseits die sogenannten STAT-Proteine (Signal Transducers and Activators of Transcription). Bisher konnte nur die Beteiligung von STAT1 und STAT3 an der Signaltransduktion der IL-6-Familie nachgewiesen werden. Die aktivierten Proteine werden in den Zellkern transloziert und induzieren dort als Hetero- oder Homodimere die Transkription sensibler Gene [Wollert, 1997].

Ein zweiter wichtiger Transduktionsweg involviert die Serin-/Threonin-kinasen Ras, Raf, MAPK (mitogen-activated protein kinase) sowie ERK1 und ERK2 (Extracellular Receptor activated Kinases) [Taga, 1997].

Zwischen beiden Systemen scheinen Querverbindungen zu existieren, die vermutlich von spezifischen Zytokinen und Geweben abhängig sind [Sheng, 1997].

Zusätzlich konnte die Beteiligung weiterer Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. über die Phosphatidylinositol-3-Kinase aufgezeigt werden [Kuwahara, 2000]. (Abb. 4)



Die zytokinvermittelten Zellreaktionen werden ebenfalls über unterschiedliche Mechanismen, wie z.B. Dephosphorylierung und proteolytischer Abbau der STAT-Proteine, Internalisierung und endolysosomaler Abbau der Rezeptorkomplexe sowie Expression verschiedener Suppressorproteine (CIS, cytokine-induced Src homology 2 containing protein) und

Inhibitorproteine (SOCS= suppressor of cytokine signaling; JAB= JAK-binding protein; SSI= STAT-induced STAT-inhibitor) antagonisiert [Aman, 1997].

1.2.4 Kardiale Wirkungen von Cardiotrophin-1

Cardiotrophin-1 induziert die Hypertrophie kultivierter Kardiomyozyten und ist hierbei wesentlich potenter als Angiotensin, Endothelin oder die übrigen IL-6-Mitglieder [Pennica, 1995a]. Hierbei kommt es durch die Anordnung neuer Sarkomeruntereinheiten in Reihe zu einer Zunahme der Zelllänge. Dies führt zu einer exzentrischen Hypertrophie und Kammerdilatation. Damit unterscheidet sich das Muster der durch CT-1 induzierten Hypertrophie von der α -adrenerg stimulierten und spiegelt die Anpassungsvorgänge bei einer chronischen Volumenbelastung wider. Zusätzlich zeigten sich Unterschiede in der Induktion fetaler Gene wie z.B. dem ANF- und dem skeletalen α -Aktin-Gen [Wollert, 1996].

Verschiedene Studien zeigten eine gegenseitige Beeinflussung von CT-1 und weiteren Hypertrophie mediators. Sano et al wiesen eine vermehrte Expression der mRNA von CT-1, IL-6 und LIF in kardialen Fibroblasten nach Angiotensin-II-Stimulation nach. Das konditionierte Medium dieser Fibroblastenkulturen bewirkte eine gp130/STAT-Aktivierung und die Hypertrophie von Myokardzellen [Sano, 2000]. Kardiale Fibroblasten produzieren den größten Anteil an CT-1 im Myokard [Kuwahara, 1999]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß ein Teil der durch Angiotensin-II induzierten Hypertrophie durch CT-1 aus kardialen Fibroblasten vermittelt wird. Im Myokardgewebe genetisch hypertensiver Ratten ist der mRNA-Spiegel für CT-1 erhöht. Dies kann schon vor dem Auftreten der konsekutiven Hypertrophie beobachtet werden [Ishikawa, 1999].

Die systemische CT-1-Administration bei Mäusen bewirkte neben einem Wachstum verschiedener Organe eine dosisabhängige Zunahme des Herzgewichts bei unbeeinflusstem Körpergewicht. Veränderungen in den Mitochondrien wiesen dabei auf eine beeinträchtigte Energiegewinnung hin [Jin, 1996]. Zusätzlich konnte eine dosisabhängige Abnahme des mittleren Arteriendrucks und des totalen peripheren Widerstandes sowie ein Anstieg der Herzfrequenz beobachtet werden. Ein Einfluß auf die Inotropie zeigte sich dagegen nicht. Aufgrund der Inhibition dieser Effekte durch einen NO-Synthase-Hemmer wurde eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) vermutet [Jin, 1998]. Hamanaka et al wiesen tatsächlich eine vermehrte Expression der induzierbaren NO-synthetase (iNOS) im Gewebe von Lunge und Aorta aber nicht im Herz nach [Hamanaka, 2000]. Die beobachteten Wirkungen sind

damit eher direkt vaskulär statt myokardial bedingt. CT-1 könnte demzufolge bei der Senkung der Nachlast in verschiedenen pathophysiologischen Situationen eine Rolle spielen.

Mäuse ohne gp130 starben noch in utero. Besonders auffällig war hierbei ein stark hypoplastischer Ventrikel [Yoshida, 1996]. Die postnatale gp130-Inaktivierung führte ebenfalls zu einer Abnahme der links- und rechtsventrikulären Wanddicke [Betz, 1998]. Im Gegensatz dazu zeigten Tiere mit einer ventrikelspezifischen gp130-Inaktivierung eine normale Herzstruktur und -funktion aber eine gestörte Adaptation an eine akute Druckbelastung (Aortenbändelung). Die Tiere entwickelten eine schwere Dilatative Kardiomyopathie und wiesen eine gesteigerte Apoptose auf. Kontrolltiere dagegen entwickelten eine kompensatorische Hypertrophie [Hirota, 1999].

Neben der hypertrophen Wirkung von CT-1 konnte ein positiver Einfluß auf den Erhalt verschiedener Zelllinien, wie z.B. Nervenzellen nachgewiesen werden [Pennica, 1996a]. Die Zugabe von CT-1 zu serumfreien Kardiomyozytenkulturen wirkte ebenfalls protektiv. Für diesen Effekt konnte die Abhängigkeit vom MAPK-assoziierten Signalweg [Sheng, 1997] sowie von der Phosphatidylinositol-kinase (PI3K) nachgewiesen werden [Kuwahara, 2000]. Es konnte auch gezeigt werden, daß NF- κ B, ein wichtiger Mediator apoptosehemmender Signalwege, für den maximalen kardioprotektiven Effekt notwendig ist [Craig, 2001].

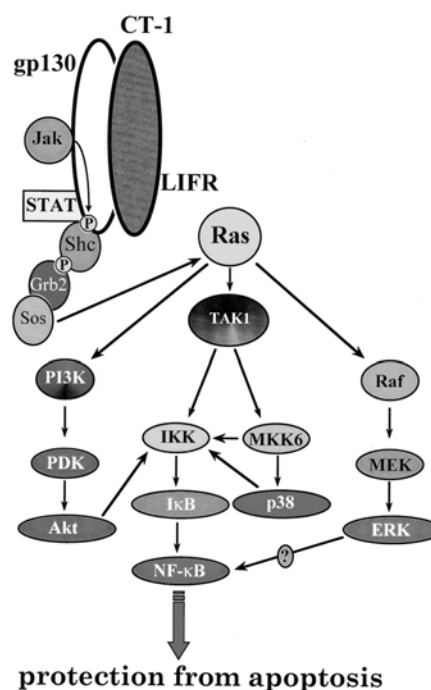


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der möglichen Signaltransduktionswege über die CT-1 die Faktoren p38, Akt, ERK aktivieren könnte, und wie diese möglicherweise gemeinsam in eine NF- κ B-Aktivierung münden. Verschiedene Studien weisen auf die zentrale Rolle dieses Faktors bei der Zytoprotektion hin. Nicht dargestellt sind die NF- κ B-unabhängigen Wege über Akt, ERK und p38 die ebenfalls an der Antiapoptose beteiligt sind. [aus Craig, 2001]

Cardiotrophin-1 hemmt die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF) nach Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) [Benigni, 1996]. Hishinuma et al konnten eine starke CT-1 mRNA-Expression im Herzgewebe der Maus nach LPS-Injektion beobachten [Hishinuma, 1999]. Somit scheint CT-1 beim Selbstschutz des Herzens vor schädigenden Einflüssen durch z.B. proinflammatorische Zytokine von Bedeutung zu sein. Diese Annahme wird durch die Induktion der Hitzeschockproteine Hsp70 und Hsp90 durch CT-1 in Ratten-Myokardzellen unterstützt. Beide Proteine sind am Schutz von Geweben vor ischämischen und thermischen Schädigungen beteiligt. In der Tat konnte CT-1 in Myozytenkulturen das Apoptoseausmaß nach Ischämie bzw. Hitzeschock reduzieren [Stephanou, 1998]. So konnte zum Beispiel in den Randzonen eines Myokardinfarktes eine Aktivierung des JAK/STAT-Transduktionsweges sowie eine Vergrößerung der Nekrosezone durch eine Hemmung der Januskinasen beobachtet werden [Negoro, 2000]. Ishikawa et al fanden erhöhte CT-1 mRNA-Spiegel im Myokard von Herzinfarktpatienten [Ishikawa, 1999]. Die herzspezifische Überexpression von STAT3 mit einer begleitenden erhöhten CT-1-Expression bewirkte den Schutz vor einer Doxorubicin-induzierten Herzinsuffizienz. [Kunisada, 2000].

Darüber hinaus ergaben mehrere Studien Hinweise auf eine Beteiligung von Cardiotrophin-1 an der Pathogenese der Herzinsuffizienz unterschiedlicher Genese. In verschiedenen Tiermodellen konnte eine gesteigerte CT-1 und gp130 mRNA-Expression im insuffizienten Myokard im Zusammenhang mit einer erhöhten Synthese von Apoptose-induzierenden Faktoren [Chandrasekar, 1996, Chandrasekar, 1998, Jougasaki, 2000] beziehungsweise einer vermehrten Hypertrophie detektiert werden.

CT-1 könnte also den Verlust myokardialer Zellen verhindern, der in eine kardiale Dysfunktion münden würde. Es ist aber auch zusätzlich eine kompensatorische Hypertrophie denkbar. Im Plasma herzinsuffizienter Patienten konnte ebenfalls ein erhöhter CT-1-Spiegel nachgewiesen werden, der eine Korrelation zu echokardiographischen Parametern einer reduzierten linksventrikulären Funktion aufwies [Talwar, 2000]. Nach Beendigung der in der vorliegenden Dissertation dargestellten experimentellen Arbeiten wiesen Zolk et al. im Myokard terminal herzinsuffizienter Patienten eine gesteigerte CT-1 und gp130 mRNA-Expression sowie CT-1-Proteinsynthese bei gleichzeitig vermindertem Gehalt des Proteins der gp130-Rezeptoruntereinheit nach. Das Verhältnis von aktivierten zu totalen STAT3-Proteinen blieb dabei unverändert. Dies weist darauf hin, daß in Endstadien der Herzinsuffizienz die Herabregulation des Rezeptors eine gesteigerte Aktivierung des Signalweges verhindert. Denkbar ist hierbei eine Degradation von gp130, der teilweise durch eine vermehrte mRNA-Expression entgegengesteuert wird [Zolk, 2002].

Cardiotrophin-1 zeigte zusätzlich auch eine STAT3-abhängige verstärkte Expression von VEGF mRNA (vascular endothelial growth factor) und Protein in Zellkulturen. Die Ergebnisse implizieren zusätzlich eine Beteiligung von CT-1 an der Kontrolle des Gefäßwachstums während des kardialen Remodelling [Funamoto, 2000a].

1.2.5 Wirkungen auf extrakardiale Gewebe

Aufgrund der weit verbreiteten Expression der Rezeptoruntereinheiten gp130 und LIFR β ist CT-1 auch in Geweben der Hämatopoese, der Leber, des Nervengewebes und der Knochen wirksam. Die Funktionen in diesen Organen überlappen sich teilweise mit denen der übrigen IL-6-Mitglieder. CT-1 inhibiert das Wachstum der myeloischen Leukämie M1 Zellen der Maus und die Differenzierung embryonaler Stammzellen [Pennica, 1995b], induziert die Bildung von Akut-Phase-Proteinen in Leberzelllinien [Peters, 1995; Richards, 1996], moduliert den Transmitter-Phänotyp sympathischer Nervenfasern, fördert das Überleben dopaminergischer und spinaler Motoneuronen [Pennica, 1995b] und ist an der Aktivierung von Osteoklasten beteiligt [Richards, 2000].

Es ist noch unklar, ob CT-1 diese Wirkungen auch *in vivo* zeigt, da die Gewebsspezifität eines Zytokins von der jeweiligen Expression der Rezeptoruntereinheiten und der nachfolgenden Aktivierung der Signaltransduktionswege abhängt.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der Rolle von Cardiotrophin-1 für die Pathogenese von Kardiomyopathien. Dies sollte durch die Identifizierung und Charakterisierung von Varianten im kodierenden und regulatorischen Bereich des humanen Cardiotrophin-1-Gens sowie durch Expressionsanalysen im menschlichen Myokard erreicht werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst die noch unbekannte Sequenz des Promotors unter Verwendung spezifischer PCR-Methoden sequenziert und die regulatorischen Funktionen mithilfe eines Luciferaseassays analysiert. Durch den Vergleich mit vorhandenen Datenbanken wurden Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren identifiziert. Für die Mutationsanalyse untersuchten wir genomische DNA mit Hilfe der SSCP-Analyse (single strand conformation polymorphism) systematisch auf Sequenzvarianten in der regulatorischen und kodierenden Region. Anschließend wurden die identifizierten Mutationen durch DNA-Sequenzierung und durch den Einsatz geeigneter Restriktionsendonukleasen weiter charakterisiert. Das Kollektiv der untersuchten Patienten setzte sich dabei neben 100 gesunden Kontrollpersonen aus Patienten mit Dilatativer sowie Hypertropher Kardiomyopathie zusammen, da durch die phänotypische Variabilität die Wahrscheinlichkeit zum Auffinden von Promotor- bzw. Proteinvarianten erhöht sein müßte, wenn diese tatsächlich an der Entstehung der untersuchten Erkrankungen beteiligt sind. Möglich, aber unwahrscheinlich sind einerseits krankheitsverursachende Mutationen, die nur bei einzelnen Patienten, aber nicht im Kontrollkollektiv zu detektieren wären. Wahrscheinlicher ist das Auffinden von Polymorphismen, die aufgrund von Veränderungen der Funktion oder Expression von Cardiotrophin die Ausprägung des Phänotyps begünstigen. Unabhängig von möglichen krankheitsbeeinflussenden Mutationen wurde weiterhin das Expressionsverhalten der CT-1 mRNA im Myokardgewebe eines kleinen Patientenkollektivs mit eingeschränkter und normaler linksventrikulärer Ejektionsfraktion sowie von gesunden Spenderherzen nach Transplantation mittels RT-PCR und HPLC-Analyse (High-pressure liquid chromatography) untersucht. Leider war es zum damaligen frühen Zeitpunkt (1997) nicht möglich, gezielt Myokardgewebe von Patienten mit Varianten in der regulatorischen Sequenz zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Beschreibung	Firma	Herkunftsort	Typenbezeichnung
Autoclav	H+P Labortechnik	München	Varioclav Typ 500
Brutschrank	Heraeus Instruments	Berlin	UT 20
Elektron. Pipette	Biohit	Köln	Proline
Elektrophoresekammern	Boehringer	Ingelheim	Blue Marin 200
	Biometra	Göttingen	Multigel long G 47
	GIBCO Brl	Eggenstein	Horizon 58
Geldokumentations-anlage	Biometra	Göttingen	TI3, Bio doc II TM , Bio doc CCD-Camera
Laborwaagen	Sartorius	Göttingen	1712004
Magnetrührer	Heidolph	München	MR 3001 K
Mikrowelle	AEG	Berlin	Micromat EEH 8733
PCR-Gerät	Perkin Elmer	Weiterstadt	Gene Amp PCR System, 9600
Photometer	Pharmacia Biotech	Cambridge, England	Ultrospec 2000
Pipetten	Eppendorf	Köln	Diverse
	Gilson	Bad Camberg	Diverse
Schüttelinkubator		Burgwedel	GFL 3033
Schüttler	Edmund Bühler	Tübingen	SM 25
Sequenzierer	Perkin Elmer	Weiterstadt	ABI Prism TM 377
Spannungsgeräte	Pharmacia Biotech	Freiburg	EPS 200
Sterile Werkbank	Heraeus Instruments	Berlin	Lamin Air HBB 2448
Thermoblock	Eppendorf	Hamburg	Thermomixer 5436
Vakuumtrockner	H.Hölzel GmbH	Deutschland	Dry Star
Vortex Mixer	Heidolph	München	REAX 2000
Wasserbad	Memmert	Schwabach	WB 7
Zentrifugen	Eppendorf	Hamburg	Centrifuge 5417R
	Heraeus Instruments	Berlin	Megafuge 1.0 R

2.1.2 Chemikalien

Firma	Herkunftsort	Produkte
Amresco	Ohio, USA	Acryl-40-Solution, Bis-2-Solution
Biozym	Hameln	Agarose Universal
Boehringer	Mannheim	DNA Molecular Weight Marker VI, Molecular Weight Marker XIII
Braun	Melsungen	Aqua ad injectabilia
Gibco BRL	Eggenstein	LB Agar, <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, 100 Bp-DNA-Ladder, PBS "ohne" Dulbecco's (w/o calcium and magnesium, w/o sodium bicarbonat), 5 X First Strand Buffer, TRIzol™ Reagenz, DTT (Dithiotreitol), Random Primers, dNTP's, SOC Medium, SuperScript™ II
Invitak	Berlin	OptiPerform™ Buffer III, OptiZyme™ Enhancer
MBI Fermentas	Vilnius	Taq I, Eco 1471, Stu I, Buffer R, BSA, Rnase-Inhibitor
Merck	Darmstadt	Borsäure, Gelatine, Natriumcarbonat, Silbernitrat, Titriplex III (Ethylendinitrotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat), Tris-base (Trishydroxymethyl-aminomethan), Ethanol, Essigsäure, Salpetersäure
Serva	Heidelberg	Ethidiumbromid, Temed
Sigma	Deisenhofen	Dimethylsulfoxid (DMSO), Formaldehyd, Formamid, Ammoniumacetat, Ampicillin, APS (Ammoniumpersulfat), Diethylpyrocarbonat, Harnstoff, SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)

2.1.3 Komplette Kits

Anwendung	Bezeichnung	Firma
Klonierung	Sure Clone Ligation Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
	TOPO TA Cloning Kit Version C	Invitrogen, Leek, Niederlande
Sequenzierung	Dye Terminator Cycle Sequencing	ABI Prism, Weiterstadt
	PRISM Sequenase Terminator	ABI, Weiterstadt
Promoter- Klonierung	Human Genome Walker Kit	Clontech, Palo Alto, USA
	Advantage Genomic PCR Kit	Clontach, Palo Alto, USA
DNA- und Plasmid-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit, QIAgen Plasmid Mini Kit	Quiagen, Hilden
Luciferaseassay	pCMV β -Gal-Vektor von Stratagene	Stratagene
	Luciferase assay system	Promega, Mannheim
	pGL3-Luciferase-Reporter-Vektor-Kit	

2.1.4 Patientenkollektiv für das Mutationsscreening in der kodierenden Region und im Promotor

Für den ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurden 64 unverwandte Patienten mit einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM), 53 unverwandte Patienten mit Hypertropher Kardiomyopathie (HCM) und 100 anonyme Kontrollpersonen (Blutspender) untersucht. Die DCM und HCM gehören zu den häufigsten Formen familiärer Kardiomyopathien und sollen daher in dieser Arbeit untersucht werden. Die Verteilungen von Alter und Geschlecht sind aus der Tabelle 3 zu entnehmen. Zusätzlich dazu wurden für das Fragment "ct1gap6" weitere 137 DCM-Patienten und 117 Kontrollen in diese Gruppe eingeschlossen (Tab. 4).

Die Diagnostik beinhaltete die internistische Anamnese, nicht-invasive (EKG, Echokardiogramm) sowie invasive kardiologische Untersuchungsmethoden gemäß der allgemein geltenden Richtlinien. Die Diagnosestellung erfolgte anschließend entsprechend der WHO-Kriterien nach Ausschluß anderer Ursachen für das klinische Erscheinungsbild.

Tab. 3: Patientenkollektiv für die Mutationssuche in der codierenden und 5'-untranslatierten Region. Alle Angaben in Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD)

Diagnosen	Anzahl	Geschlecht		Durchschnittsalter
		weiblich	männlich	
Dilatative Kardiomyopathie	64	13 (20,3%)	51 (79,7%)	50,3 \pm 7,1 Jahre
Hypertrophe Kardiomyopathie	53	17 (32,1%)	36 (67,9%)	55,0 \pm 9,2 Jahre
Kontrollgruppe	100	37 (37%)	63 (63%)	34,7 \pm 10,0 Jahre

Tab. 4: Erweitertes Patientenkollektiv für das Fragment "ct1gap6". (MW \pm SD)

Diagnosen	Anzahl	Geschlecht		Durchschnittsalter
		weiblich	männlich	
Dilatative Kardiomyopathie	201	39 (19,4%)	162 (80,6%)	48,9 \pm 8,1 Jahre
Hypertrophe Kardiomyopathie	53	17 (32,1%)	36 (67,9%)	55,0 \pm 9,2 Jahre
Kontrollgruppe	217	67 (69,1%)	150 (30,9%)	33,4 \pm 8,8 Jahre

Vor der Blutabnahme wurden alle untersuchten Patienten über die geplanten molekulargenetischen Untersuchungen informiert und um ihr mündliches und schriftliches Einverständnis dafür gebeten.

Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt.

2.1.5 Patientenkollektiv für die Quantifizierung der Cardiotrophin-1 mRNA

Zur Quantifizierung wurde RNA aus Myokardbiopsien des rechten Ventrikels von 6 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (LVEF < 40%), 3 Kontrollpatienten mit normaler bzw. leicht eingeschränkter LV-Funktion und 5 Patienten nach orthotoper Herztransplantation isoliert. Alle Personen stellten sich im Deutschen Herzzentrum Berlin (DHZB) zur Diagnoseklärung, beziehungsweise zur Kontrolluntersuchung, zur invasiven kardiologischen Diagnostik vor. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Untersuchungen stand nur dieser geringe Umfang an Biopsiematerial zur Verfügung und konnte aufgrund des invasiven Eingriffes nicht weiter vergrößert werden. Allgemeine Angaben bezüglich Geschlechts- und Altersverteilung und klinischer Parameter sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5: Charakteristika des Patientenkollektivs für die mRNA-Quantifizierung. (MW±SD)

Charakteristika	Chronische Herzinsuffizienz (= CHI)	Patienten nach Herztransplantation (=TX)	Kontrollen (=KO)
Gesamtanzahl	6	5	3
Geschlechtsverteilung			
weiblich (in%)	0 (0)	1 (20)	2 (66,7)
männlich (in%)	6 (100)	4 (80)	1 (33,3)
Durchschnittsalter	48,8 ± 11,2 Jahre	51,2 ± 13,6 Jahre	37,3 ± 15,3 Jahre
LVEF im Durchschnitt in %	35 ± 4	62 ± 11	73 ± 10

Tab. 6: Ergebnisse der RNA-Extraktion. (CHI=Chronische Herzinsuffizienz, KO=Kontrollen, TX=Transplantat)

Probe	RNA (µg / µl)	Volumen (µl)	Gesamt-RNA (µg)	RNA-Ausbeute (µg/mg FG)
CHI 1	0,21	25	5,3	0,53
CHI 2	0,27	25	6,63	0,46
CHI 3	0,17	25	4,36	0,74
CHI 4	0,13	25	3,28	0,60
CHI 5	0,32	25	7,96	0,46
CHI 6	0,23	25	5,66	0,44
KO 1	0,07	25	1,78	0,56
KO 2	0,31	25	7,73	0,60
KO 3	0,1	25	2,6	0,43
TX 1	0,1	25	2,57	0,48
TX 2	0,13	20	2,57	0,31
TX 3	0,11	25	2,73	0,48
TX 4	0,22	25	5,51	0,44
TX 5	0,09	25	2,33	0,54

Die folgenden Tabellen 7 bis 11 geben das Alter, die Krankheitsursachen, wichtige kardiale Funktionsparameter und die medikamentöse Therapie für jeden Patienten wieder.

Tab. 7: : Klinische Daten der Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF). ACEI= ACE-Hemmer, COLD=Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung, CHI=Chronische Herzinsuffizienz, DCM=Dilatative Cardiomyopathie

Probe	Geschlecht	Alter (1995)	Diagnose	LVEF (%)	ACEI	Diuretika	b-Blocker	Glykoside	Ca-Antag.	Nitrate
CHI 1	m	64	DCM	33	ja	ja	nein	ja	nein	ja
CHI 2	m	52	DCM	39	nein	nein	ja	nein	nein	nein
CHI 3	m	37	Myokardinfarkt bei V.a. Marfan-Syndrom	35	ja	ja	nein	ja	nein	nein
CHI 4	m	60	DCM	28	ja	ja	nein	nein	nein	nein
CHI 5	m	33	DCM	39	ja	nein	nein	ja	nein	nein
CHI 6	m	47	DCM	37	ja	ja	nein	ja	nein	nein

Tab. 8: Klinische Daten der Patienten aus den beiden Kontrollgruppen. KO=Kontrollen, TX=Transplantat

Probe	Geschlecht	Alter (1995)	Diagnose	LVEF (%)	ACEI	Diuretika	b-Blocker	Glykoside	Ca-Antag.	Nitrate
KO 1	w	59	V.a. HCM	82	nein	nein	ja	nein	nein	nein
KO 2	w	27	rezidivierende Sinustachykardien	78	nein	nein	ja	nein	nein	nein
KO 3	m	26	Z.n. Myokardinfarkt	60	nein	nein	nein	nein	ja	nein
TX 1	m	29	HOCM	80	nein	nein	nein	nein	nein	ja
TX 2	m	61	DCM	58	ja	ja	nein	nein	nein	nein
TX 3	w	43	DCM	63	ja	ja	nein	nein	ja	nein
TX 4	m	56	terminale ischämische Kardiomyopathie	66	ja	nein	nein	nein	nein	nein
TX 5	m	67	DCM	45	ja	ja	nein	ja	nein	nein

Tab. 9: Daten der links- und rechtsventrikulären Katheterisierung der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz. EDV=Enddiastolisches Volumen, ESV= Endsystolisches Volumen, EDMD= Enddiastolische Muskeldicke, LVMl= Linksventrikulärer Masseindex, SVl= Schlagvolumenindex, RVEF= Rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion.

Probe	EDV li (ml/qm)	ESV li (ml/qm)	EDMD li (cm)	LVMl (g/qm)	LVEF (%)	EDV re (ml/qm)	ESV re (ml/qm)	SVInd. (ml/qm)	RVEF (%)
CHI 1	244	164	0,5	89	33	99	46	54	54
CHI 2	127	77	1	144	39	42	22	20	48
CHI 3	378	246	0,9	218	35	150	68	82	55
CHI 4	103	74	1,2	151	28	37	22	15	40
CHI 5	176	108	1,1	194	39	144	75	68	48
CHI 6	189	119	1	162	37	116	64	52	45

Tab. 10: Daten der links- und rechtsventrikulären Katheterisierung der Kontrollgruppen. KO=Kontrollen, TX= Patienten nach Herztransplantation, EDV=Enddiastolisches Volumen, ESV= Endsystolisches Volumen, EDMD= Enddiastolische Muskeldicke, LVMl= Linksventrikulärer Masseindex, SVl= Schlagvolumenindex, RVEF= Rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion

Probe	EDV li (ml/qm)	ESV li (ml/qm)	EDMD li (cm)	LVMl (g/qm)	LVEF (%)	EDV re (ml/qm)	ESV re (ml/qm)	SVInd. (ml/qm)	RVEF (%)
KO 1	90	16	1,2	141	82	53	14	39	73
KO 2	70	15	0,7	67	78	48	8	41	84
KO 3	136	55	1	150	60	136	53	83	61
TX 1	46	9	1,1	91	80	31	9	22	71
TX 2	37	16	0,1	3	58	29	9	20	70
TX 3	71	26	0,7	64	63	72	23	49	68
TX 4	72	24	0,8	83	66	30	14	17	55
TX 5	81	23	1	102	45	48	16	32	67

Tab. 11: Immunsuppressive Behandlung der Patienten nach Herztransplantation

Probe	Ciclosporin A	Azathioprin	Cortisonpräparat
TX 1	ja	ja	ja
TX 2	ja	nein	ja
TX 3	ja	ja	ja
TX 4	ja	ja	ja
TX 5	ja	ja	ja

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle in der Studie verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer“, Version 5.0 für den kodierenden Bereich aus der von Pennica et al [**Pennica, 1996b**] veröffentlichten Sequenz der CT-1 DNA und aus der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenz für die 5'-untranslatierte Region ausgewählt. Die Synthese erfolgte durch die Firmen Applied Biosystems (Weiterstadt) und Invitek GmbH (Berlin).

Die Tabellen 12 bis 18 im Kapitel 2.2.4.1 "Polymerase-Ketten-Reaktion" enthalten die Charakteristika der Primer, die Fragmentlängen der Produkte, die Annealingtemperaturen und weitere Reaktionsbedingungen.

2.2 Methoden

2.2.1 Überblick

Da die Sequenz der 5'-untranslatierten Region zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht vorlag, wurde ausgehend vom Exon 1, ein ca. 1100 bp großes Fragment mit dem GenomeWalker Kit (Clontech, Heidelberg, Germany) amplifiziert, anschließend kloniert und sequenziert.

Zur Funktionsanalyse dieser Region erfolgte die Fusion von sechs 5'-terminalen Deletions-Mutanten (-1091/+39 bis -218/+39) mit einem Luciferase-Reportergen und die Transfektion in COS-7 Zellen. Anschließend konnte die Aktivität in einem Luciferaseassay gemessen werden.

Die kodierende und 5'-untranslatierte Region des humanen Cardiotrophin-1-Gens wurde systematisch bei insgesamt 217 Personen auf mögliche Varianten untersucht. Diese Gruppe setzte sich aus 64 Personen mit Dilatativer Kardiomyopathie und 53 Personen mit Hypertropher Kardiomyopathie zusammen. Als Kontrollgruppe dienten 100 anonyme Kontrollpersonen.

Die kodierende Region wurde einschließlich der Exon-Intron-Übergänge bei allen Probanden auf DNA-Ebene mit 6 PCR-Fragmenten (ctlexon 1, ctlexon 2, ctlexon 3.1., ctlexon 3.2., ctlexon 3.3., ctlexon 3.4.), von denen sich die Fragmente des Exon 3 überlappen, amplifiziert. Die Variantensuche in der 5'-untranslatierten Region erfolgte mit 7 sich überlappenden PCR-Fragmenten (ct1Prom1F/ct1prb, ct1 rep, ct1gap2, ct1gap3, ct1gap4, ct1gap5, ct1gap6).

An die Amplifikation mittels PCR schloß sich die SSCP-Analyse aller Fragmente bei Raumtemperatur und 4°C an. Bei gesicherten Veränderungen im Laufmuster erfolgte die Klonierung des entsprechenden Fragmentes in einen E.coli-Vektor und die anschließende Sequenzierung.

Die nachfolgende Bestätigung der Sequenzveränderungen und die Überprüfung des Patienten- und Kontrollkollektivs erfolgte mittels Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse. Teilweise war hierfür ein Amplification-Created-Restriction-Site-(ACRS)-Assay notwendig.

Für die Untersuchung des Expressionsverhaltens wurde die mRNA aus Myokardbiopsien von insgesamt 14 Probanden, darunter 6 Patienten mit verminderter Linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF), 5 Patienten nach Herztransplantation und 3 Kontrollen mit normaler LVEF isoliert und mittels RT (Reverse Transkriptions)-PCR amplifiziert. Daran schloß sich die

semiquantitative Analyse mittels HPLC an. Für die externe Standardisierung diente die PDH-mRNA.

2.2.2 Klonierung und Sequenzierung der 5'-untranslatierten Region

Unter Verwendung des Genome Walker Kits (Clontech, Heidelberg) konnten 1,1 kb des 5'-flankierenden Bereiches des humanen Cardiotrophin-1 Gens kloniert und sequenziert werden.

Dieses Kit besteht aus 5 "Bibliotheken" spezie-spezifischer genomischer DNA. Hierfür wurde die DNA mit 5 verschiedenen Restriktionsenzymen (EcoR V, Sca I, Dra I, Pvu II, Ssp I) geschnitten und mit einer Adaptorsequenz ligiert. Die "Bibliotheken" dienten als Matritze in einer "nested"-PCR mit Gen-spezifischen Primern (GSP) und im Kit enthaltenen Adapter-Primern (AP) [Tabelle 12]

Tab. 12: Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung der 5'-flankierenden Region

	Adapterspezifisch (forward)	3'-Ende des Exon 1 (reverse)
1. PCR	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	3'-TTAGGGAGACTGAGGACGC-5'
2. PCR	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'	3'-ACTGAGGACGCGGGGAGTCGC-5'

Dabei dienten die Produkte der 1. PCR als Ausgangsmatritze für die anschließende "nested"-PCR. Beide Reaktionen wurden mit dem Advantage Genomic PCR Kit (Clontech, Heidelberg) ausgeführt. Dieses ist insbesondere für die Amplifikation langer Fragmente geeignet. Die dabei verwendete Polymerase ist zusätzlich in der Lage, Fehler zu erkennen und zu korrigieren.

Als Endprodukt entstand ein 1,1 kb-Fragment. Dieses wurde wie unter 2.2.3. beschrieben kloniert und sequenziert.

2.2.3 Funktionsanalyse der 5'-untranslatierten Region

Dieser Teil der Arbeit hatte das Ziel, die erhaltene Sequenz der 5'-untranslatierten Region hinsichtlich ihrer regulatorischen Eigenschaften auf die Genexpression mit Hilfe der Reportergen-Analyse zu untersuchen. Hierfür wird die zu untersuchende Sequenz in einen Vektor kloniert, der stromabwärts der Klonierungsstelle ein Reportergen enthält. Dieser Vektor

wird dann in geeignete Zellen, die das Reportergen nicht enthalten, eingeschleust (Transfektion), in denen die Expression erfolgt.

Das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem bestand aus COS-7-Zellen (SV40-transformierte Nieren-Zell-Linie Afrikanischer Grüner Meerkatzen) und dem Luciferase-Gen (Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*)). Luciferase katalysiert die Oxidation des Luciferins, wobei gelbgrünes Licht emittiert wird, das bereits in geringer Stärke nachweisbar ist (10^{-20} M Luciferase = 0,001pg). Dieses System ist sehr sensitiv, effektiv und unabhängig von posttranslationalen Modifikationen. Dadurch besteht die Reportergen-Funktion sofort nach der Translation und ist direkt von der regulatorischen Stärke der zu untersuchenden Sequenz abhängig.

Verwendet wurde der pGL3-Basic-Vektor, der weder Promotor- noch Enhancer-Sequenzen besitzt (pGL3-Luciferase-Reporter-Vektor-Kit, Promega). Die Expression des Luciferase-Gens ist somit vollständig vom eingefügten PCR-Konstrukt abhängig. Als externe Kontrolle diente der pGL3-Control-Vektor, der die SV40 (Semian Virus 40)-Promotor- und Enhancer-Sequenzen enthält. Zur internen Kontrolle wurde ein Vektor verwendet, der das β -Galaktosidase-Gen als Reportergen enthält (β -Galaktosidase Enzyme Assay System, Promega). Dieser Vektor wird zusammen mit dem Luciferase-Vektor in die Zellen kotransfiziert und dient als Maß für die Menge des in die Zelle aufgenommenen Plasmids.

2.2.3.1 Herstellung und Klonierung der 5'-Deletions-Fragmente

Für die Analyse der funktionellen Aktivität einzelner Bereiche der 5'-flankierenden Region wurden Fragmente synthetisiert, die unterschiedlich weit in die interessierende Sequenz hineinreichen. Hierfür wurde jeweils der Primer "exon 1 Reverse" (5'-AATCCCTCTGACTCCTGCG-3') mit einem der Vorwärts-Primer kombiniert, die auch zur Variantensuche eingesetzt wurden (Tab. 13).

Nach dem im Kapitel 2.2.4.1 beschriebenen Standardprotokoll erfolgte die Amplifikation dieser Fragmente. Die Reaktionsbedingungen waren für alle Primerpaare einheitlich (Primermenge: 10 pmol, DNA-Menge: 60 ng, keine PCR-Zusätze, Annealingtemperatur: 60 °C).

Tab. 13: Vorwärtsprimer für die Amplifizierung der Promotorkonstrukte. Zur Lage der Primer siehe Tabelle 16 im Kapitel 2.2.4.1.

Bezeichnung	Vorwärts-Primer	Sequenz des Vorwärts-Primers	Fragmentlänge
gap 1	ctlgap 1 F	5'-GCCCGGGCTGGTATTTAC-3'	1173 bp
gap 2	ctlgap 2 F	5'-CACTCACACGAACACACGC-3'	1029 bp
gap 3	ctlgap 3 F	5'-TGGGCTTCCTCGACAGAC-3'	821 bp
gap 4	ctlgap 4 F	5'-GCCTGCTAAGAAGAGGAGAGC-3'	639 bp
gap 5	ctlgap 5 F	5'-ATTCTGTCTGCCAGTCC-3'	459 bp
gap 6	ctlgap 6 F	5'-CAACTTGCCTTCCCCCTC-3'	300 bp

Für die Klonierung der PCR-Fragmente in den Luciferase-Vektor, wurden die Enden so modifiziert, daß sie zu den überhängenden Enden des Vektors komplementär sind. Dies erfolgte durch die vorherige Klonierung in den pCR[®]-TOPO-Vektor (TOPO TA Cloning[®] Kit). Nach der Bestätigung der Insertion des Fragmentes mittels PCR sowie der korrekten Orientierung durch Sequenzierung der positiven Klone wurde das Insert durch die Restriktionsenzyme Kpn I und Xho I aus dem Vektor herausgeschnitten und für die weitere Klonierung aufbereitet. Der pGL3-Basic-Luciferase Reporter Vektor wurde ebenfalls mit diesen beiden Enzymen vorbereitet. Das Einfügen der Konstrukte in den Vektor erfolgte unter Verwendung des TA Cloning[™] Kits der Firma Clontech entsprechend den Herstellerangaben. Anschließend wurden 10 Kolonien je Fragment ausgewählt und mittels Insert-spezifischer PCR überprüft. Um eventuelle Fehler in den Sequenzen der Fragmente auszuschließen, wurden alle positiven Klone sequenziert.

Tab. 14: Charakteristika der zur Klonierung eingesetzten Restriktionsenzyme

Enzym	Isolationsquelle	Erkennungssequenz	Temperatur	Zusatz zum Verdau
Kpn I	Klebsiella pneumoniae OK8	5'...GGTAC [↓] C...3' 3'...C [↑] CATGG...3'	37 °C	BSA
Xho I	Xanthomonas holcicola	5'...C [↓] TCGA G...3' 3'...G AGCT [↑] C...5'	37 °C	BSA

2.2.3.2 Transfektion der COS-7 Zellen

Die wie oben beschrieben vorbereiteten Luciferase-Reportergen-Konstrukte wurden anschließend in COS-7-Zellen eingebracht. Dafür wurden die Zellen nach entsprechender Vorbereitung einer Elektroporation unterworfen. Durch diesen rein physikalischen Vorgang kommt es zur kurzfristigen Permeabilitätserhöhung der Zellmembranen durch Pulse eines elektrischen Feldes ausreichender Stärke. Der zugrundeliegende Mechanismus, "Reversible Electrical Breakdown" (REB, Reversibler elektrischer Zusammenbruch) genannt, tritt bei Erreichen eines Membranpotentials von 0,5-1,5V auf und wird von einer kurzfristigen Porenbildung gefolgt, was wiederum das Eindringen der Plasmide erleichtert [Neumann, 1982]. Die hier verwendeten COS-7-Zellen wurden durch Trypsin aus ihrer Zellkultur gelöst und in Vollmedium (500 ml DMEM mit 4,5 g Glucose/l, 10 % FKS "inaktiv" (fötales Kälberserum), 2,5 ml Gentamycin) suspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte unter einem Mikroskop bestimmt, die 1×10^7 /ml betragen sollte.

Dann wurde der DNA-Ansatz vorbereitet, der sich wie folgt zusammensetzte:

CT1-Promoter-Luciferase-Reportergen-Konstrukt	10 µg
pCMV-β-Gal-Vektor (Kontrolle der Transfektionseffizienz)	5 µg
pBSSK (Carrier-DNA, pBluescriptSK+, Stratagene)	15 µg
steriler TE-Puffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)	ad 50 ml

Zusätzlich dazu wurde mindestens ein Ansatz mit dem pGL3-Control-Vektor als Positiv-Kontrolle (enthält SV40 Promoter- und Enhancersequenzen) in die Untersuchung mit aufgenommen.

Für die Elektroporation wurden dann genau 300 µl COS-7-Zellen ($=3 \times 10^6$ Zellen) je Ansatz in Küvetten vorgelegt, mit dem DNA-Ansatz vermischt und anschließend bei 250 V und 1200µF elektroporiert. Danach wurden sie sofort in die 6-Loch-Platten überführt.

2.2.3.3 Luciferase-Assay und β -Galaktosidase-Assay

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen erneut mit Trypsin aus der Kultur gelöst und im Medium suspendiert. Für das eigentliche Assay wurden die Zellen anschließend lysiert. Anschließend wurden 50 μ l des gereinigten Lysats mit 50 μ l Luciferase-Assay-Reagenz (20mM Tricin, 0.07mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.67mM MgSO_4 , 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270 μ M Coenzym A, 470 μ M Luciferin, 530 μ M ATP; pH 7.8) versetzt und die Intensität der entstehenden Lichtsignale sofort im Luminometer gemessen.

Die Intensität des Lichtes bleibt für etwa 20 sec. konstant und fällt danach langsam mit einer Halbwertszeit von 5 min ab.

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde in dieser Arbeit das für die β -Galaktosidase kodierende Reportergen eingesetzt, von dem bekannt ist, daß es bei einer Ko-Transfektion proportional zum pGL3-Vektor in die Zellen aufgenommen wird (pCMV β -Gal-Vektor, Stratagene; enthält den Promotor des Cytomegalie-Virus).

Die β -Galaktosidase hydrolysiert die Substanz o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) zu o-Nitrophenol und Galaktose. O-Nitrophenol hat eine gelbe Farbe, deren Intensität sich bei einer Wellenlänge von 420 nm (Optimum) in einem Spektrometer messen läßt.

Um die Aktivität dieses Enzyms zu bestimmen, werden 20 μ l des Zelllysats in 96-Loch-Platten nach folgendem Schema vorgelegt:

Blank, nur 1x Zellysispuffer

1. β -Gal-Verdünnung 1:10 in Lysispuffer

2. 1:20

3. 1:40

usw. bis 1:1280

Anschließend werden 20 μ l der Beta-Gal-Reagenz (120mM Na_2HPO_4 , 80mM NaH_2PO_4 , 2mM MgCl_2 , 100mM β -Mercaptoethanol, 1.33mg/ml ONPG) hinzugegeben. Sobald sich das Gemisch gelb verfärbt, wird die Reaktion gestoppt, indem 40 μ l einer Natriumbicarbonat-Stopplösung hinzupipettiert werden. Dies sollte mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen, mit der die Reagenz hinzugegeben wurde.

Danach muß die Intensität sofort bei 450 bzw. 630 nm (Referenz) gemessen werden.

2.2.4 Variantensuche in der kodierenden und 5'-untranslatierten Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens

2.2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, polymerase chain reaction)

Durch diese von Mullis und Saiki et al. erstmals 1986 [Saiki, 1986] beschriebene Methode, lassen sich *in vitro* einzelne Sequenzen aus genomischer DNA mit dem Enzym *Taq*DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigen, um ausreichend Material für weitergehende Untersuchungen wie z.B. die SSCP-Analyse zur Verfügung zu stellen. Im ersten Schritt und zu Beginn eines jeden weiteren Zyklus erfolgt die Hitzedenaturierung der DNA. Die dabei entstehenden Einzelstränge stellen die Matritze für die Synthese der komplementären Stränge durch die *Taq*DNA-Polymerase dar. Für diesen Schritt werden zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) benötigt, die sich unter geeigneten Bedingungen komplementär zur Sequenz am 5'-Ende (Vorwärtsprimer, "F") und am 3'-Ende (Rückwärtsprimer, "R") anlagern. Daran anschließend erfolgt die Elongation der Stränge. [Rolfs, 1992; Passarge, 1994].

Die Exone 1 und 2 der kodierenden Sequenz konnten einschließlich der Exon-/Intron-Übergänge mit jeweils einem Primerpaar amplifiziert werden. Für alle übrigen Bereiche wurden überlappende Fragmente generiert.

Die folgenden Tabellen stellen eine Übersicht über die Sequenzen und Charakteristika der eingesetzten Oligonukleotide dar.

Tab. 15: Charakteristika der Primerpaare für den kodierenden Bereich des humanen CT-1 Gens.

Primer	Sequenz	Nukleotidposition	Fragmentgröße
ct1 exon1 F	5'-GTGAAGGGAGCCGGGATC-3'	-32→ -15	115 bp
ct1 exon1 R	3'-AATCCCTCTGACTCCTGCG-5'	+59→ +41	
ct1 exon2 F	5'-TCATTCCTCCCCCTTTC-3'	-27→ -10	163 bp
ct1 exon2 R	3'-CACCCCCATTCCCACTCA-5'	+19→ +2	
ct1 exon3.1. F	5'-CCGGCCGTGTCTCCGCA-3'	-18→ -2	201 bp
ct1 exon3.1. R	3'-GGCCTGGCGGCGACACA-5'	+327→ +311	
ct1 exon3.2. F	5'-GGGCTGCCAGTGCACGAGC-3'	+238→ +256	186 bp
ct1 exon3.2. R	3'-GGCCAGCAAGGCCTCCACG-5'	+426→ +406	
ct1 exon3.3. F	5'-CTGCGCCGCCTGGAGGAC-3'	+355→ +372	234 bp
ct1 exon3.3. R	3'-CAGCAGCTGGCCAGGTCG-5'	+588→ +570	
ct1 exon3.4. F	5'-CTACCGCGAGTGGCTGAG-3'	+540→ +557	207 bp
ct1 exon3.4. R	3'-CACAAAAAGCAAAGAAGGCC-5'	+140→ +121	

Die Bezeichnung der Positionen erfolgte anhand der von Pennica et al. (1996) veröffentlichten cDNA-Sequenz. Das Startcodon (ATG) wurde als Position +1 definiert. Für die Primer "ct1exon 1R", "ct1exon 2R" und "ct1 exon 3.4.R" bezieht sich die Position +1 auf die jeweils erste Base des nachfolgenden Introns. Die Primerpaare "ct1exon 1 F/R" und "ct1exon 2 F/R" amplifizieren das vollständige Exon 1 respektive Exon 2 inklusive der Exon-Intron-Übergänge.

Tab. 16: Charakteristika der Primerpaare für die 5'-untranslatierte Region des humanen CT-1 Gens.

Primer	Sequenz	Nukleotidposition	Fragmentgröße
ct1 prom1 F	5'-ACACATGTGATTGTGGGCC-3'	-1065→ -1047	139 bp
ct1 prb	3'-GCGTGTGTTCGTGTGAGTG-5'	-928→ -946	
ct1 rep F	5'-TCCAGCAATTGTCTGCTCAC-3'	-981→ -962	298 bp
ct1 rep R	3'-TCCATACTTGTTTCTGGCC-5'	-684→ -703	
ct1 gap2 F	5'-CACTCACACGAACACACGC-3'	-946→ -928	263 bp
ct1 gap2 R	3'-TCCATACTTGTTTCTGGCC-5'	-684→ -703	
ct1 gap3 F	5'-TGGGCTTCCTCGACAGAC-3'	-738→ -721	241 bp
ct1 gap3 R	3'-CTCATTGTACACCCACC-5'	-498→ -517	
ct1 gap4 F	5'-GCCTGCTAAGAAGAGGAGAGC-3'	-556→ -536	266 bp
ct1 gap4 R	3'-TCAGGCTTGGACCTGAGG-5'	-291→ -308	
ct1 gap5 F	5'-ATTCTGTCTGCCAGTCC-3'	-376→ -358	266 bp
ct1 gap5 R	3'-AACATTTCATCCTACCCCC-5'	-111→ -131	
ct1 gap6 F	5'-CAACTGCCTTCCCCCTC-3'	-217→ -200	247 bp
ct1 gap6 R	3'-CTTACCAGACTTCCCTCCC-5'	+30→ +11	

Die Bezeichnung der Positionen erfolgte anhand der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenz für die 5'-UTR. Die Position -1 bezieht sich auf die erste Base in 5'-Richtung vom Startcodon (ATG) des Exon 1.

Aufgrund des hohen GC-Gehalts und einer vermehrten Sekundärstrukturbildung der Einzelstränge war für einige Fragmente der Zusatz von deionisiertem Formamid bzw. DMSO

zum PCR-Ansatz notwendig. Beide Zusätze verhindern ein Reannealing der Einzelstränge und das Auftreten von Sekundärstrukturen [Rolf, 1992]. Das Fragment "ct1Prom1F/ct1prb" ließ sich auch nach Zugabe der oben erwähnten Chemikalien nicht optimal amplifizieren. Bessere Ergebnisse waren erst durch den Einsatz eines speziellen Puffers und enzymatischen "Enhancers", zwei Reaktionsbestandteilen des "CombiPol™DNA Polymerase Mix" von InViTek (Berlin), zu erreichen.

Tab. 17: Reaktionsbedingungen der Primerpaare für die Mutationssuche im kodierenden Bereich sowie der 5'-UTR.

Primer	Annealing temperatur	PCR-Zusatz	Primermenge	DNA-Menge
ct1 exon 1	54 °C	5 % Formamid *	10 pmol	80 ng
ct1 exon 2	60 °C	keine Zusätze	10 pmol	60 ng
ct1 exon 3.1.	62 °C	12 % DMSO	5 pmol	60 ng
ct1 exon 3.2.	62 °C	12 % DMSO	5 pmol	60 ng
ct1 exon 3.3.	62 °C	12 % DMSO	10 pmol	60 ng
ct1 exon 3.4.	46 °C	16 % DMSO	10 pmol	60 ng
ct1prom1F/ct1prb	56 °C	CombiPol-Puffer und Enhancer	10 pmol	80 ng
übrige Primerct1				
rep - ct1 gap6	60 °C	keine Zusätze	10 pmol	60 ng

*Die Prozentangaben beziehen sich auf 25 µl des gesamten PCR-Ansatzes

Die PCR-Reaktionen wurden standardisiert nach folgendem Programm mit dem Thermocycler PE 9600 (Perkin Elmer) durchgeführt (exklusive Fragment "ct1Prom1F/ct1prb") Für das Fragment "ct1Prom1F/ct1prb" war die Anwendung eines Zyklusprofils mit verlängerten Zeiten notwendig (Angaben in Klammern):

A	initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
	Denaturierung	94 °C	20 sec (45 sec)	
B	Primer-Annealing	siehe Tabelle	20 sec (30 sec)	35 Zyklen
	Primer-Elongation	72 °C	20 sec (30 sec)	
C	finale Elongation	72 °C	10 min	

Ein PCR-Standardansatz (exklusive "ct1Prom1F/ct1prb) bestand aus:

PCR-Puffer	2,5 µl (1M KCl, 1M Tris-HCl, 1M MgCl ₂ , 0,5g Gelatine)
dNTP's	4,0 µl (200 µM jedes Nukleotids/µl)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,2 µl (5U/µl)
Primer	5 bzw. 10 pmol (0,5-1,0µl) (siehe Tab. 15, 16)
DNA	3 bzw. 4 µl (20 ng/µl) (siehe Tab. 17)
Formamid bzw. DMSO	in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tab. 17)
PCR-H ₂ O	bis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl

Wie bereits oben erwähnt, wurde ein abweichender PCR-Ansatz für das Fragment "ct1Prom1F/ct1prb" verwendet, der sich durch den Einsatz des OptiPerformTM Buffer III (10X), von 1,0 µl MgCl (50mM) sowie von 2,0 µl OptiZymeTM Enhancer (5X) vom Standardansatz unterschied (siehe auch Tab. 17).

2.2.4.2 Einzelstrang-Konformationsanalyse (Single-strand-conformation-polymorphism- (SSCP)-analysis)

Die SSCP-Analyse [Orita, 1989] ist eine einfache, sensitive, kostengünstige und häufig gebrauchte Methode zum Auffinden von Sequenzvarianten. Dazu werden die doppelsträngigen PCR-Amplifikate durch Hitzedenaturierung voneinander getrennt und diese Einzelstränge dann in einem nicht-denaturierendem Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei kommt es in Abhängigkeit von der Primärsequenz zur Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen. Sequenzunterschiede zwischen Wildtyp und mutierter DNA können zu einer veränderten Sekundärstruktur und damit zu einem unterschiedlichen Laufverhalten eines oder beider Stränge führen, was sich wiederum in einem veränderten Bandenmuster niederschlägt [Orita, 1989; Condie, 1993; Glavac, 1993].

Durch dieses Verfahren ist es nach Grompe [Grompe, 1993] möglich, 70-97 % der Varianten in PCR-Fragmenten von bis zu 200 bp Länge zu detektieren. Mit zunehmender Größe der PCR-Produkte reduziert sich die Sensitivität auf z.B. weniger als 50 % bei Fragmenten größer als 400 bp. Die Sensitivität läßt sich durch die Wahl der Elektrophoresebedingungen (Temperaturen, Gelzusammensetzung) erhöhen. Durch die Wahl zweier verschiedener Laufbedingungen läßt sich die Sensitivität auf bis zu 98 % erhöhen. Da sich anhand des Bandenmusters keine Rückschlüsse auf Art und Lokalisation der Mutationen ziehen lassen, ist eine anschließende Sequenzierung abweichender PCR-Produkte notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 10 %ige Polyacrylamid-Gele (Acrylamid : Bisacrylamid 49:1) angefertigt. Die Herstellung erfolgte unter Verwendung eines speziellen Glasplattensystems (Elektrophoresekammer Multigel-Long Typ G 47, Größe 110x120x1 mm, Biometra). Als Gel- und Elektrophoreselaufpuffer diente 0,5 facher TBE-Puffer.

Da das Laufverhalten temperaturabhängig ist, wurde jedes PCR-Fragment bei Raumtemperatur (RT) und bei 4°C analysiert, um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte dann bei 60 V (RT) bzw. 70 V (4°C) für 16-18 Stunden je nach Fragmentlänge.

Die anschließende Sichtbarmachung der DNA ist durch die Silbernitratfärbung nach Budowle et al. [Budowle, 1991] auch nicht-radioaktiv möglich. Damit lassen sich Fragmente ab einer Länge von 50 bp anfärben. Kürzere DNA-Fragmente sind aufgrund der zu geringen DNA-Menge nicht mehr eindeutig darstellbar.

Die Silberfärbung wurde nach folgendem Standardprotokoll durchgeführt:

- 1.) Fixierung der DNA im Gel mit 10%igem Ethanol (ETOH) für mindestens 10 Minuten
- 2.) pH-Wert-Einstellung mit 1%iger HNO_3 -Lösung für mindestens 2 Minuten
- 3.) Färbung der Gele in 200 ml 2%iger AgNO_3 -Lösung unter Zugabe von 200 μl Formaldehyd für 20-30 Minuten (Anlagerung der Silberionen an die DNA)
- 4.) dreimaliges Waschen in Aqua dest. zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Silberionen
- 5.) Entwicklung in insgesamt 600 ml 30%iger NaCO_3 -Lösung unter Zugabe von 300 μl Formaldehyd durch dreimaliges Wechseln der Lösung
- 6.) Fixierung der Gele in 10%iger Essigsäure für mindestens 10 Minuten

Anschließend wurden die Gele auf Whatman-Filterpapier aufgezogen und in einem Vakuumtrockner bei 80°C für 1,5 Stunden getrocknet, um sie für Dokumentationszwecke haltbar zu machen.

2.2.4.3 Klonierung von PCR-Fragmenten

Das in dieser Arbeit eingesetzte Sequenzierungsverfahren machte das Vorliegen des mutierten Allels im homozygoten Zustand notwendig. Hierfür wurden die zu sequenzierenden PCR-Fragmente in geeignete Vektoren kloniert. Zum Einsatz kam das TA TOPO Cloning Kit von Invitrogen (Niederlande). Dieses System macht sich die Eigenschaft der *Taq*-Polymerase zunutze, an das 3'-Ende des PCR-Produktes Desoxyadenoside (A) anzufügen. Der eingesetzte Vektor besitzt am 5'-Ende überhängende Desoxythymidine (T). Dadurch erfolgt die Ligation ohne weitere Enzyme bei Raumtemperatur [Shuman, 1994].

Als Vektor dient hierbei der "pCR 2.1-TOPO-Vektor". Die Klonierungsreaktion erfolgte analog den Herstellerangaben. Der Klonierungserfolg wurde anschließend mittels Insert-spezifischer PCR überprüft. Zusätzlich wurden unter Verwendung eines Polyacrylamidgels (Heteroduplex-Analyse) diejenigen Kolonien identifiziert, die jeweils nur das mutierte bzw. Wildtypallel enthielten.

Für die nachfolgenden Schritte wurde die Plasmid-DNA mit dem Quiagen Plasmid Mini Kit (Quiagen) isoliert. Dieses Verfahren basiert auf der Alkalischen Lyse-Methode von Birnboim und Doly [Birnboim, 1979], gefolgt durch die Bindung der Plasmid-DNA an den Anionenaustauscher Resin bei geeigneten niedrigen Salz- und pH-Bedingungen. Die Isolation

erfolgte nach Herstellerprotokoll. Anschließend wurden die Konzentrationen der Plasmid-DNA bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt.

2.2.4.4 Sequenzierung der DNA

Die DNA-Sequenzanalyse erfolgte analog dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. [Sanger, 1977] auf einem automatischen DNA-Sequenziergerät von Perkin Elmer (ABI Prism TM 377 DNA-Sequencer). Bei dieser Methode werden als Sequenzier-Primer Oligonukleotide eingesetzt, die zu einem Bereich der Plasmid-DNA komplementär sind. In dieser Arbeit wurden der M13-Forwardprimer und T7-Reverseprimer (Tabelle 18) verwendet. Zusätzlich zu den Desoxyribonukleotiden (dNTP's) werden auch Didesoxyribonukleotide (ddNTP's) eingefügt, die nach ihrem Einbau durch die Polymerase zu einem Abbruch der Kettenverlängerung führen, da sie an Position 3 des Zuckerrestes ein H-Atom anstatt der üblichen OH-Gruppe besitzen. Dadurch ist eine Verlängerung des DNA-Stranges von Position 3 zum nächsten Nukleotid nicht mehr möglich. Zur späteren Unterscheidung der einzelnen Didesoxyribonukleotide sind diese durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe mit voneinander differierenden Emissions- und Absorptionsspektren markiert. Das Endprodukt dieser Sequenzierungs-PCR stellt somit eine Serie von Polynukleotiden dar, die der Summe aller möglichen Fragmente eines DNA-Segmentes entsprechen. Das 3'-Ende jedes Polynukleotids trägt dabei eine farbstoffmarkierte Base. Die Durchführung der Sequenzierungsreaktion erfolgte mittels "PRISM TM DNA Sequencing Kit Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction TM" nach Herstellerangaben im Thermocycler Perkin Elmer Gene Amp 9600.

Tab. 18: Spezifische Sequenzierungsprimer für den pCR 2.1-TOPO-Vektor

Primer	Primersequenz	Nukleotidposition	Annealingtemperatur
M 13F	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	205 -> 221	50 °C
T 7R	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	383 -> 364	50 °C

Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Terminator Premix	4,0 µl (ddNTP's, dNTP's, Ampli Taq DNA-Polymerase mit temperaturstabiler Pyrophosphatase, MgCl ₂ , Tris-HCl, pH 9.0)
Plasmid-DNA	600 ng
Sequenzierungsprimer	1,6 µl (3,2 pmol)
Aqua ad inject	bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl

Für den Plus- und den Minus-Strang des PCR-Produktes wurde jeweils ein getrennter Ansatz mit dem Vorwärts- respektive Rückwärtsprimer angefertigt.

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte nach folgendem Standardprofil:

Denaturierung	96 °C	10 sec	
Primer-Annealing	50 °C	10 sec	25 Zyklen
Primer-Elongation	60 °C	4 min	

Nach der Sequenzierungs-PCR ist es notwendig, überschüssige ddNTP's zu entfernen, die aufgrund ihrer fluoreszierenden Eigenschaft die automatische Sequenzanalyse verfälschen würden. Hierfür dienten Sephadex G50-Säulen (Pharmacia), die nach Herstellerangaben vorbereitet wurden.

Die in der PCR entstandenen Fragmente wurden auf einem mit 6 M Harnstoff versetztem 4,5 % denaturierendem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Zeitversetzt zur Auftrennung der Fragmente regt ein Laser die fluoreszenzmarkierten Basen zur Sekundärstrahlung an. Ein Photomultiplier verstärkt die entstehenden Lichtsignale und wandelt sie in ein elektrisches, digitales Signal um.

2.2.4.5 Direkte Sequenzierung des PCR-Produktes

Im Verlauf der Arbeit etablierte die beteiligte Arbeitsgruppe ein neues Verfahren zur Bestimmung der Nukleotidsequenz eines DNA-Fragmentes. Dies ermöglicht den direkten Einsatz des PCR-Produktes ohne vorherige Klonierung. Neben den fluoreszenzmarkierten

Didesoxynukleotiden (Dye Terminator-Methode) kommen hier sequenzspezifische Primer zur Anwendung. Dies ist mit einer erheblichen Zeit- und Kostenersparnis verbunden. Darüber hinaus ist die Erfolgsrate höher, da diese Methode unabhängig von klonierungsbedingten Störungen ist, wie z.B. fehlendem oder falschem Einbau in das Plasmid oder Verlust des Fragmentes während der Plasmidpräparation. Da die Vorteile überwiegen, wurden nach der Optimierung und Überprüfung der Methode mit bekannten Sequenzen und dem Vergleich zwischen altem und neuem Verfahren, einzelne Fragmente der 5'-UTR nach dieser neuen Methode sequenziert.

Hierfür wurde zunächst das PCR-Produkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen) aufgereinigt, um störende Reaktionskomponenten wie z.B. dNTP's und Primer, zu entfernen. Nach dieser Aufreinigung wurden 1-2 µl in die Sequenzierungs-PCR eingesetzt. Der weitere Ablauf erfolgt wie bereits unter 2.2.4.4. beschrieben.

2.2.4.6 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse

Eine sichere und schnelle Methode zur Genotypisierung einer bereits identifizierten Sequenzvariante ist die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus(RFLP)-Analyse [Cooper, 1984]. Dieses Verfahren macht sich die Fähigkeit bestimmter bakterieller Enzyme zunutze, doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen aus meist vier bis sechs Nukleotiden zu schneiden. Diese Sequenzen werden häufig durch eine Mutation zerstört oder neu gebildet. Je nach Vorhandensein der Mutation entstehen unterschiedliche Fragmentmuster. Geeignete Restriktionsenzyme wurden mit dem Computerprogramm "Husar" des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg (DKFZ) über das Computernetzwerk "Internet" ausgewählt.

Der Restriktionsenzymverdau erfolgte analog den Herstellerangaben für das jeweilige Restriktionsenzym. Ein Ansatz besteht aus 1,5 µl eines Puffers (Zusammensetzung abhängig von Hersteller und Enzym), 5-10 U Enzym, 0,15 µl BSA (je nach Enzym) und Aqua ad inject. bis zu einem Gesamtvolumen von 8 µl. Diesem Gemisch wurden 7 µl PCR-Produkt hinzugegeben. Danach erfolgte der Enzymverdau im Wasserbad bei der jeweils enzymespezifischen Temperatur über Nacht (Tab. 19).

Anschließend wurde das Ergebnis auf einem 10%igen Polyacrylamidgel (49:1 Acrylamid: Bisacrylamid; 0,5x TBE) überprüft (siehe Kapitel 2.2.4.2.) Der Genotyp der untersuchten Personen wurde anhand der Größe der sich darstellenden Banden ausgewertet.

Tab. 19: Charakteristika der für die RFLP eingesetzten Restriktionsendonuklease

Restriktionsenzym	Isolationsquelle	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Temperatur
Ear I	Enterobacter aerogenes	5'...CTC T TC(N) ₁ ↓...3' 3'...GAGAAG(N) ₄ ↑...5'	37 °C

2.2.4.7 Amplification created Restriction Site-(ACRS-)Assay

Nicht jede Variante bildet oder zerstört eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease. In diesem Fall ist es möglich, durch sogenannte "mismatch"-Primer eine Restriktionsschnittstelle in das PCR-Amplifikat einzufügen [Haliassos, 1989; Eiken, 1991] (Abb.6). Diese künstliche Schnittstelle ist nur im Zusammenhang mit einer Mutation funktionell.

	Wildtyp	Mutante
	* ↓	* ↓
Template-Allel	5'...CTGGACGCGGCGGCG...3'	5'...CTGGACGCGACGGCG...3'
3'-Ende des "mismatch"-Primers	5'...CTGGACTCG...3'	5'...CTGGACTCG...3'
PCR-Produkt	5'...CTGGACTCGGCGGCG...3'	5'...CTGGACT↓CGACGGCG...3'
	keine <i>Taq I</i> Schnittstelle	<i>Taq I</i> Schnittstelle vorhanden

Abb. 6: Prinzip des ACRS-Assay. Darstellung anhand der Variante +274 G→A im Fragment "ctlexon3.2.". Die Sterne markieren die Position des "mismatch"; die Pfeile die Position der Variante.

Beim Design des Primers ist zu beachten, daß er direkt vor der mutierten Base endet und an der dritt- oder viertletzten Stelle vor dem 3'-Ende den "mismatch" enthält. An dieser Position beeinträchtigt die nicht-komplementäre Base die Amplifikation des PCR-Fragmentes in geringerem Umfang als bei der Lage direkt am 3'-Ende.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 20 aufgelistet. Die PCR erfolgte nach den Bedingungen, die in Tabelle 21 dargestellt sind. Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend analog der RFLP-Analyse mit den in Tabelle 22 dargestellten Restriktionsenzymen untersucht.

Tab. 20: Charakteristika der "mismatch"-Primer für den Artificial-Created-Restriction-Site(ACRS)-Assay.

Primer	Sequenz	Nukleotidposition	Fragmentgröße	Endonuklease
ct1 mod F	5'-CGGCTGCGGCTGGAC [↓] ICG-3'	+256→+273	171 bp	Taq I
ct1 mod R	3'-CGCGGCCAGCAAGGCCT-5'	+426→+410		
cta Mnl I	5'-GGGCCAAGGAATCCTGTCTCAAGAG-3'	-154→-131	185 bp	Mnl I
ct1 gap6 R	3'-CTTACCCAGACTTCCCTCCC-5'	+30→+11		

Die Bezeichnung der Positionen erfolgte anhand der von Pennica et al. (1996) veröffentlichten Sequenz für die cDNA, und der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Sequenz der 5'-UTR des humanen Cardiotrophin-1 Gen. Als Position "+1" wurde das Startcodon (ATG) im Exon 1 definiert. Die hervorgehobene Base kennzeichnet den "mismatch"

Tab. 21: Reaktionsbedingungen der Primerpaare, die im ACRS-Assay eingesetzt wurden

Primer	Annealingtemperatur	PCR-Zusatz	Primermenge	DNA-Menge
ct1 mod F/R	43 °C	16 % DMSO	10 pmol	60 ng
ctaMnlI/ct1gap6R	58 °C	keine Zuätze	10 pmol	60 ng

Tab. 22: Restriktionsendonukleasen, die beim ACRS-Assay zum Einsatz kamen

Restriktionsenzym	Isolationsquelle	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Temperatur	Reaktionszusatz
Taq I	Thermus aquaticus	5'...T [↓] CG A...3' 3'...A GC [↑] T...5'	65 °C	BSA
Mnl I	Moraxella nonliquefaciens	5'...GCTC(N) ₇ [↓] ...3' 3'...GGAG(N) ₆ [↑] ...5'	37 °C	BSA

BSA=Bovines Serumalbumin

2.2.5 Quantifizierung der mRNA des humanen CT-1- Gens in Myokardbiopsien

Cardiotrophin-1 gehört zu den Genen, die hauptsächlich in der Embryonalphase exprimiert werden. Zur Zeit ist erst wenig darüber bekannt, unter welchen Bedingungen die Expression dieses Gens in späteren Lebensphasen reguliert wird.

Um das Ausmaß der Expression eines Gens zu bestimmen, läßt sich die mRNA aus den zu untersuchenden Geweben isolieren, mittels RT-PCR vervielfältigen und die Endmenge der PCR-Produkte durch geeignete Methoden quantifizieren. In dieser Arbeit wurde eine semiquantitative, nicht-radioaktive Methode angewandt, da zum Zeitpunkt der Untersuchung spezifischere quantitative, intern standardisierte Methoden in der Arbeitsgruppe noch nicht etabliert waren. Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um die High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie).

Da die Effektivität der PCR von vielen Faktoren beeinflusst wird, die zu starken Schwankungen der Produktmenge führen können, ist es notwendig, einen Standard einzusetzen. Dazu eignen sich Gene, die in konstanten Mengen unabhängig von äußeren Faktoren exprimiert werden (sogenannte *housekeeping*-Gene). Etabliert haben sich dafür die Gene der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAPDH). Da von dem letzteren Gen sogenannte Pseudogene (Intron-lose kodierende Sequenzen) bekannt sind, die sich auch auf DNA-Ebene amplifizieren lassen, wurde in dieser Arbeit das PDH-Gen zur externen Standardisierung eingesetzt. Auf eine interne Standardisierung wurde trotz der höheren Genauigkeit verzichtet, da die hier gewünschte semiquantitative Analyse in einer kleinen Patientengruppe den Arbeitsaufwand zur Herstellung eines internen Standards nicht rechtfertigte. Da die Polymerase-Kettenreaktion einer exponentiellen Funktion folgt, muß vor der Quantifizierung für jedes Gen und jede Probenart bestimmt werden, bei welcher Zykluszahl das Plateau erreicht wird. Die anschließende Quantifizierung erfolgt dann im ansteigenden Bereich, da in dieser Phase eine annähernd lineare Zunahme des PCR-Produktes vorliegt.

2.2.5.1 RNA-Isolierung aus Myokardbiopsien

Bei dem Umgang mit RNA besteht jederzeit die Gefahr, daß die RNA durch zytoplasmatische, kontaminierende oder ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen) gespalten und abgebaut wird. Aus diesem Grunde wurden alle Arbeitsschritte der RNA-Isolierung auf Eis ausgeführt. Zusätzlich wurden eventuell vorhandene Nukleasen durch Behandlung aller eingesetzten Materialien mit 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) inaktiviert.

Die menschliche RNA wurde aus Endomyokardbiopsien des rechten Ventrikels gewonnen, sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die Isolierung erfolgte mit Trizol™-Reagenz nach einem Standardprotokoll.

Für die anschließende Ermittlung der RNA-Konzentration wurde die Optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt und die Konzentration mit der folgenden Formel berechnet:

$$c \text{ µg/ml} = \text{Extinktion 260 nm} \times \text{Verdünnung} \times F \text{ (40 für RNA)}$$

Der dabei erhaltene Wert sollte >0,1 bzw. <1,0 sein.

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung diente die OD-Messung auch zur Beurteilung möglicher Proteinkontaminationen durch die Berechnung des Reinheitskoeffizienten:

$$E_{260} : E_{280}$$

Dieser sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

2.2.5.2 Reverse Transkription (RT)

Da RNA mit der ursprünglichen PCR-Methode nicht amplifizierbar ist, wurde die Methode der Reversen Transkription entwickelt, bei der ausgehend vom RNA-Strang die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert wird, die dann als Ausgangsmaterial für die PCR dient. Hierbei wird die Reverse Transkriptase, ein Enzym aus Retroviren (RNA-Viren), eingesetzt.

Für diese Reaktion wurden 500 ng RNA mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Als Primer für die Reverse Transkriptase dienten Oligonukleotid-Hexamere unterschiedlicher Sequenz (Random-Primer, 300ng/µl, Gibco BRL), von denen 2µl eingesetzt wurden. Dieses Gemisch wurde bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert (Annealing der Primer). Anschließend erfolgte die sofortige Weiterbearbeitung der Proben bei 50 °C.

Der Mastermix für die weitere Transkription bestand aus 4 µl First-Strand-Buffer (250 mM tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl DTT, 1µl 10 mM dNTP's, 0,2 µl RNasin, 1 µl Reverse

Transkriptase (SuperScript™ II, GibcoBRL, 200 U/μl) und DEPC-H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 9 μl. Die Herstellung dieses Gemisches erfolgte bei 42 °C.

Nach einer 10minütigen Inkubation wurden 9 μl des Mastermixes zum ersten Ansatz hinzugegeben, dieses Gemisch bei 50 °C für weitere 50 Minuten inkubiert und anschließend das Enzym bei 95 °C für 5 Minuten inaktiviert.

Das Vorwärmen des Mastermixes und das Aufbewahren der Proben bei 50 °C war aufgrund der ausgeprägten Sekundärstrukturbildung der CT-1 mRNA notwendig. Es konnte nachgewiesen werden, daß sich dabei eine höhere Ausbeute an RNA ergab.

Anschließend an die RT erfolgte das Verdünnen der Produkte auf eine Endkonzentration von 5 ng/μl.

2.2.5.3 Polymerase Kettenreaktion der cDNA

Zur mRNA-Quantifizierung sollten Intron-überspannende Primer bevorzugt werden, da dadurch keine Amplifikation möglicher DNA-Kontaminationen erfolgt. Für den Ausschluß einer Amplifikation von Intron-losen Pseudogenen sollten alle Proben nach der RNA-Isolation mit einer DNase verdaut werden, um mögliche DNA-Kontaminationen abzubauen. Die Ausbeute der in dieser Arbeit analysierten Gewebeproben war zu gering, um dieses Verfahren anzuwenden, bei dem hohe RNA-Verluste auftreten. Um trotzdem eine Amplifikation auf DNA-Ebene auszuschließen, wurde von jeder Probe das Produkt der RNA-Isolation in die PCR eingesetzt, ohne diese vorher revers zu transkribieren.

Die Auswahl des Primer-Paares erfolgte ebenfalls mit dem Computerprogramm "Husar". Das dabei gewählte Primer-Paar beginnt im Exon 1 und endet nach dem Exon 3 innerhalb der 3'-flankierenden Region, die noch in mRNA umgesetzt wird. Es entstand ein Fragment mit einer Länge von 310 bp.

ct1 cDNA Vorwärts-Primer:	5'-CCGGAGGGAGGGAAGTCTGGA-3'	T _m =70°C
ct1 cDNA Rückwärts-Primer:	3'-ACACACTGCGTCCAGCAGCG-5'	T _m =66°C

PDH-Primer:

Vorwärts:	5'-TGCTTGGAGAAGAAGTTGCC-3'
Rückwärts:	3'-AGGTCACGTGTTACCCCCAGA-5'

Die Amplifikation der cDNA erfolgte nach der Hot Start Methode, bei der die Primer erst bei 95°C mit dem Template und dem Enzym in Kontakt kommen. Dadurch wird die Synthese unspezifischer Nebenprodukte bereits bei niedrigeren Temperaturen verhindert.

Zuerst wurde das Primergemisches (je 8 pmol) vorgelegt und anschließend mit Wachs überschichtet. Danach erfolgte die Herstellung des Mastermixes, der sich aus 2,5 µl PCR-Puffer, 0,75 µl MgCl₂, 4 µl dNTP's (200 µmol) und 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl) zusammensetzte und mit Aqua ad inject. auf eine Gesamtmenge von 10 µl je Ansatz aufgefüllt wurde. Aufgrund der bereits erwähnten Sekundärstrukturbildung der CT-1 cDNA wurden außerdem 1,75 µl DMSO (entspricht 7%) jedem Ansatz für die Amplifikation des CT-1-Fragmentes hinzugefügt.

Der Reaktionsansatz (10 µl) wurde dann auf den ausgehärteten Wachs pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl (=50 ng) cDNA; 10 µl (50 ng) DNA (positiv-Kontrolle) oder 10 µl Aqua ad inject. (negativ-Kontrolle). Die Amplifikation von CT-1 erfolgte für jede Probe im Doppelansatz. Für jede Probe wurde außerdem das PDH-Gen parallel amplifiziert. Zur Kontrolle auf eine mögliche Amplifikation von CT-1 auf DNA-Ebene, wurden 50 ng der nicht-umgeschriebenen RNA je Probe im gleichen Ansatz amplifiziert.

Die PCR erfolgte anschließend nach folgendem Profil:

A	initiale Denaturierung	96 °C	5 min.	
	Denaturierung	96 °C	45 sec.	
B	Primer-Annealing	60 °C	60 sec.	34 Zyklen CT-1
	Elongation	72 °C	45 sec.	30 Zyklen PDH
C	terminale Elongation	72 °C	5 min.	

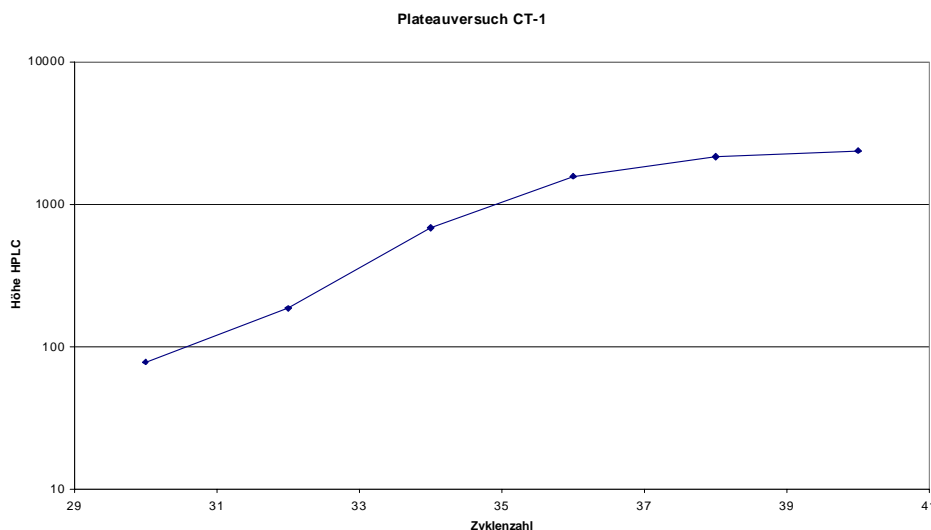


Abb. 7: Graphische Darstellung der HPLC-Daten des Plateauversuches für CT-1. Da die Amplifizierung der PCR-Produkte einer exponentiellen Funktion folgt, wurden die Daten logarithmisch aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß bei einer Zykluszahl von 30 die Vervielfältigung der Proben noch sicher im linear ansteigenden Bereich liegt. Das Plateau beginnt bei einer Zykluszahl von ca. 36.

2.2.5.4 High-Pressure-Liquid-Chromatography (HPLC, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)

Mit dieser Form der Chromatographie lassen sich PCR-Fragmente nicht-radioaktiv quantitativ mit einer hohen Sensitivität bestimmen.

Für die Quantifizierung wurde das verdünnte PCR-Produkt in die HPLC eingespritzt und die DNA an eine DEAE (Diethylaminoethyl)-Säule (Gynotek, 3,5x0,46cm, Perkin Elmer) gebunden. Die Trennung erfolgte dabei nach dem Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie, wobei es sich hier um einen Anionenaustauscher handelt. Die PCR-Fragmente wurden anschließend durch einen mehrstufig ansteigenden Natriumchloridgradienten von der Säule eluiert. Dieser Gradient wird durch eine unterschiedliche Mischung der beiden Eluenten A und B erreicht:

Eluent A : 25 mM (3,03 g/l) Trizma Base pH 9,0

Eluent B : 25 mM (3,03 g/l) Trizma Base, 1 M (58,4 g/l) NaCl pH 9,0

Die Laufbedingungen wurden wie folgt definiert: Flußrate 1ml/min, Gradient von 75% Eluent A+25 % Eluent B zu 100% Eluent B nach 15 min.

Anschließend erfolgte die photometrische Messung der Amplifikate bei einer Wellenlänge von 260 nm (Spektral-Photometer SP4, Gynotek, Perkin Elmer) und die Integration der Extinktion zu entsprechenden Flächen mittels Integrator-Software[™] (Nelson Analytical Inc., USA).

In die Auswertung können die Flächen bzw. die Höhen der entstehenden Amplituden einbezogen werden. In dieser Arbeit wurde die Höhe verwendet, da bei einem Teil der Proben doppelgipflige Amplituden auftraten. In diesem Falle würde die Verwendung der Flächen zu einer Verfälschung der Werte führen.

2.2.5.5 Statistik

Sofern nicht gesondert gekennzeichnet, sind alle Werte als Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) angegeben. Differenzen zwischen Gruppen wurden mit dem Student-t-Test untersucht (Software: MS Excel 9.0/2000 mit ANOVA Statistikfunktion, StatView 4.5). Differenzen mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant akzeptiert. Die Ermittlung der Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Pearson. Unterschiede zwischen beobachteten Allelfrequenzen wurden unter Verwendung des Chi-Quadrat-Test (mit Yates-Korrektur) analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der 5'-untranslatierten Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens

3.1.1 Sequenz des 1113 bp langen 5'-flankierenden Bereichs des humanen CT-1 Gens und mögliche Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen

Nach dem im Kapitel 2.2.2 dargestellten Prinzip konnte aus der mit Ssp I geschnittenen DNA-Bibliothek ein PCR-Fragment von circa 1.1 kb isoliert werden.

Die Länge von etwa 1100 bp überschritt die Lesekapazitäten des DNA-Sequenziergerätes. Nach der Sequenzierung des Fragmentes in beide Richtungen blieb die Basenpaarfolge eines ca. 400 bp langen zentralen Fragmentes unbekannt. Aus diesem Grunde wurde anhand der bereits erhaltenen Sequenzdaten ein Primerpaar generiert, mit dessen Hilfe sich dieser Abschnitt amplifizieren und die Sequenz vervollständigen ließ.

Tab. 23: Primerpaar für die Amplifikation und Sequenzierung des zentralen Segmentes der 1.1 kb langen 5'-UTR des humanen Cardiotrophin-1 Gens

Primer	Sequenz	Nukleotidposition	Fragment-länge	Annealingtemp.
Gap F	5'-TCATTCACAAACCCATTAGC-3'	-771→ -751		
Gap R	3'-GCATCCCAATGTTCTGCC-5'	-267→ -284	505 bp	58 °C

Nach mehrmaliger Sequenzierung und Vergleich aller erhaltener Daten konnte die in Abbildung 3.4. dargestellte Sequenz für die ca. 1.1 kb lange 5'-flankierende Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens ermittelt werden.

Mit Hilfe der Transkriptionsfaktor-Datenbank TRANSFAC (Heidelberg) ist es möglich, DNA-Sequenzen bezüglich möglicher Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren anhand der bereits bekannten und bestätigten Konsensussequenzen zu untersuchen [Wingender, 1997]. Die Analyse ergab für die in dieser Arbeit ermittelte Sequenz mehrere potentielle *cis*-aktive Elemente.

Innerhalb des 5'-flankierenden Bereichs des CT-1 Gens befinden sich zwei CAAT-Boxen an den Positionen -1043 und -1076, wobei die letztere gleichzeitig eine C/EBPbeta-Bindungsstelle darstellt. An der Position -984 besteht eine potentielle STAT-Bindungsstelle. Außerdem ergab der Vergleich mit den Datenbanken eine mögliche SP1-Erkennungssequenz an der Position -582. Zusätzlich dazu konnten insgesamt 9 AP-2-Bindungsstellen identifiziert werden, die sich an den Positionen -716, -438, -266, -251, -248, -207, -181, -73 und -72 befinden. Ebenfalls vorhanden ist ein sogenanntes "cAMP responsiveness Element" (CRE), das an der Position -639 lokalisiert ist. Die Position -484 stellt außerdem eine Bindungsstelle für GATA-bindende Faktoren dar. An Position -619 befindet sich eine mögliche AP-1-Bindungsstelle. Die hier identifizierte Sequenz des mutmaßlichen CT-1-Promotors enthält keine TATA-Box, die sich in den meisten eukarioten Genen ca. 25 bp stromaufwärts des Startcodons befindet. Alle erwähnten Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind in der Abbildung 8 gekennzeichnet.

```

CT1F
-1112 ATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTATTTACAGTTAATACACATGTGATTGT
      CCAAT   E47
-1052 GGGCCCTACCAATTGTCTGGCTCAATTCTATCTGCTGTGCCCTCTCCAGTTAAACTCTTT
      STAT   CEBPB                               CT2F
-992  CTTCTTTTATTCCAGCAATTGTCTGCTCACGGCAATACACACACCCACTCACACGAACAC
-932  ACGCACACACATGCACGCGCACATGCACACACGCGCACACCTGCACACTCACACGCACAC
-872  AAATCCACTCGCACACACGCATGCTCACACGCACACACGTCCGCATGCACGCACACACGC
-812  AGACACACGCAAGCGCACACACACACGGGCCTCCTCGTCTTCATTACAAACCCATTAG
      CT3F                               AP2
-752  CTTCTGTGTCTATGGGCTTCCTCGACAGACCGCGAGCCCCTCGCGGGGGCCAGAAACCA
                               CREB
-692  AGTATGGATCATCCCTATGTGCCTTCCTTTCCGTCTACACCAGGTTAATGGGGTTGACGT
      AP1                               SP1
-632  ATGGGTGTGACTTCCTGTCCAGGTCTCTGTAGCTTGTTCTCCTGGGGGTGGGGGCGGGG
      CT4F
-572  TGTGATTGTTACTAGGCCTGCTAAGAAGAGGAGAGCAGTGTATCTGTCTCCCTCCTGGTG
      GATA3
      GATA2
      GATA1
-512  GGTGTGACAATGAGATTGGAAGCCATCTAAGATAGGCCAGGAGATGTATGTCTGGACAAA
      AP2
-452  CATGCCCCAAGCCTGACGGCCCCCATCGTAGCCTCCCTCGCAAGCCGCGCCCCAGACTAG
      CT5F
-392  AGAGAGGGCCTGCGCATTCTCTGCTGCCAGTCCGGCAGTTCCTCTCCTGTCTCCTCAG
-332  CTTTACACCCAAAGCAGCCGCTGCCTCAGGTCCAAGCCTGAGCCCGCGGCAGAACATTGG
      AP2
      AP2                               CT6F
-272  GCTGCCTCCCAGGCCCTGACACCCCCAGCCCCGAGGTCTGTCCACCCGGCAGACACACTT
      AP2                               AP2
-212  GCCTTCCCCCTCGGGCCCCCTTCCCCCACTAGGCCCCACGGACGAGGAGCTGAGCTCAGGG
-152  CCAAGGAATCCTGTCTCAAAGGGGGGGTAGGATGAAATGTTTGGGGTCTGGGCTCTGAT
      AP2
      AP2
-92   TGGCTGCGCCCGGGCCACGCCCCAGCCCTTTCCCTTTCTCCCCCTCGAAAGGGGGC
      +1   Exon 1
-32   GTGAAGGGAGCCGGGATCAGCCAGGGGCCAGCATGAGCCGGAGGGAGGGAAGTCTGGGTA
      SP1                               CT1ex1R
+29   AGGGGCTGAGGGACCGGACGCCGGGTGCTGAGGGGCGCAGGAGTCAGAGGGATT

```

Abb. 8: Sequenz der 5'-untranslatierten Region des humanen Cardiotrophin-Gens. Unterstrichen sind die zur Herstellung der Deletionsfragmente eingesetzten Primer (CT1F-CT6F und CT1ex1R). Die Numerierung erfolgte ausgehend vom ATG-Startcodon im Exon 1. Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktorbindungsstellen (entsprechend der TRANSFAC-Analyse) sind durch den jeweiligen Faktor markiert. Die Sequenz wurde in der EMBL-Datenbank mit der Zugangsnummer AJ002743 registriert.

3.2 Promotor-Aktivität der 5'-untranslatierten Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens

Für den Nachweis einer möglichen Promotoraktivität der hier sequenzierten 1.1 kb langen 5'-flankierenden Sequenz wurden sechs 5'-terminal deletierte Fragmente mit den in der Tab. 24 dargestellten Positionen und Längen konstruiert.

Tab. 24: 5'-terminal deletierte Fragmente für die Funktionsanalyse der 5'-UTR des humanen CT-1 Gens

Fragment	Positionen	Länge
CT 1	-1091 → +39	1173 bp
CT 2	-947 → +39	1029 bp
CT 3	-739 → +39	821 bp
CT 4	-557 → +39	639 bp
CT 5	-377 → +39	459 bp
CT 6	-218 → +39	300 bp

Im Vergleich zum promotorlosen Kontrollvektor pGL3-Basic wiesen alle untersuchten Konstrukte eine signifikante Promotoraktivität in COS-7-Zellen auf (n=3, p<0,05). Hierbei zeigten der Abschnitt von +39 bis -218 (=CT6) sowie von +39 bis -739 (CT3) die höchste Aktivität.

Die Konstrukte CT5 und CT1 weisen verminderte Aktivitäten auf. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Bereiche zwischen -1091 bis -739 sowie zwischen -739 und -218 die CT-1 Expression supprimieren könnten (Tab. 25, Abb. 9).

Tab. 25: Ergebnisse der Luciferase-Aktivitätsmessung (n=3) nach der Normalisierung mit den entsprechenden β -Galaktosidase-aktivitäten

Konstrukt	Versuch Nr: 1	Versuch Nr: 2	Versuch Nr: 3	Mittelwert	Standard abweichung	in Prozent	p
CT 1	17,7	22,5	29,0	23,1	4,6	20	0,02
CT 2	17,1	29,3	28,7	25,0	5,6	22	0,03
CT 3	29,0	32,1	36,0	32,4	2,9	9	0,01
CT 4	22,0	29,0	26,0	25,7	2,9	11	0,01
CT 5	21,4	25,5	24,6	23,8	1,8	7	0,01
CT 6	29,6	37,0	35,3	34,0	3,2	9	0,01
pGL3	1,0	1,0	1,0	1,0	0	0	

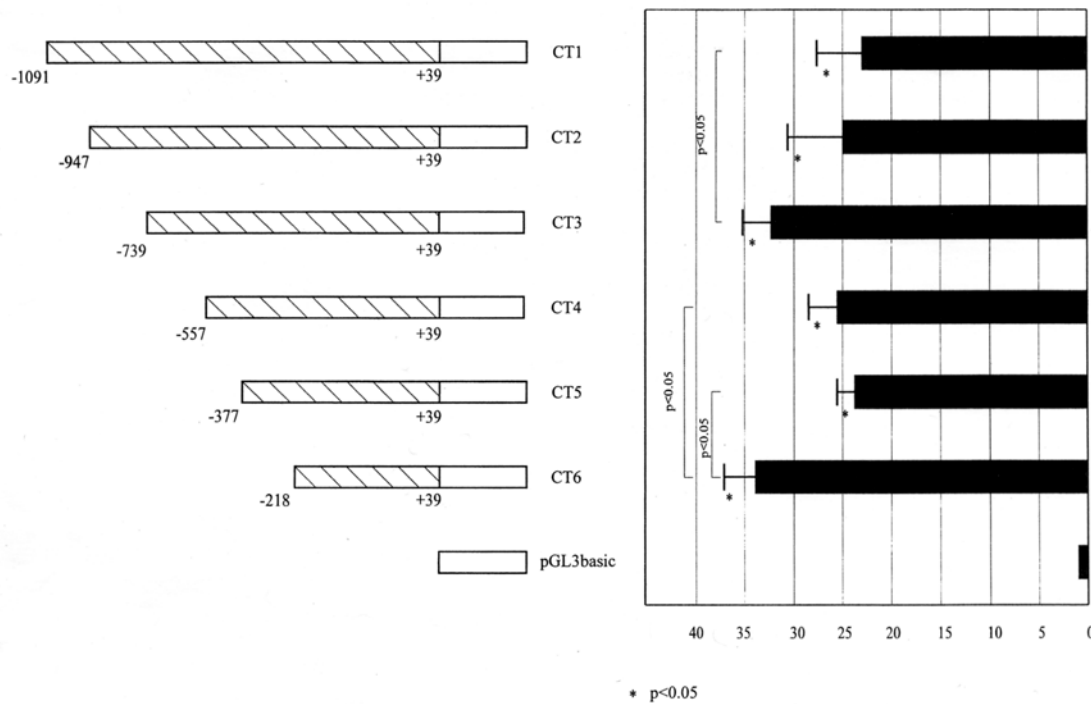


Abb. 9: Basale Promotoraktivität der sechs 5'-terminalen Deletionsfragmente. COS-7-Zellen wurden mit Konstrukten transfiziert, die Fragmente der 5'-flankierenden Region des humanen CT-1-Gens (quergestreifte Boxen) enthielten. Diese wurden in die „upstream“-Region des Luciferase-Gens (offene Box) integriert. Die mittlere relative Luciferaseaktivität (Balkendiagramm rechts) wurde durch mindestens drei Transfektionen bestimmt und im Vergleich zur β -Galaktosidaseaktivität normalisiert. Alle Daten werden in Relation zum pGL3basic-Vektor (Aktivität = 1) dargestellt.

3.3 Varianten in der kodierenden Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens

Insgesamt wurden 898 bp der kodierenden Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens einschließlich der Exon-Intron-Übergänge mittels PCR-/SSCP-Analyse untersucht. Dazu wurde dieser Genbereich in 6 Fragmente unterteilt, von denen die Fragmente "ctl exon1" und "ctl exon2" jeweils das gesamte Exon 1 respektive Exon 2 umschließen. Bei den übrigen 4 Fragmenten handelt es sich um überlappende Bereiche des Exon 3 einschließlich der Exon-Intron-Übergänge (Abb. 10). Durch diese Analyse ließ sich eine seltene Variante identifizieren. Nachfolgend wird diese bezüglich ihrer Lage, der Veränderung der Gensequenz, der Verfahrensweise bei der Genotypisierung und der Häufigkeit ihres Auftretens im untersuchten Patientenkollektiv beschrieben.

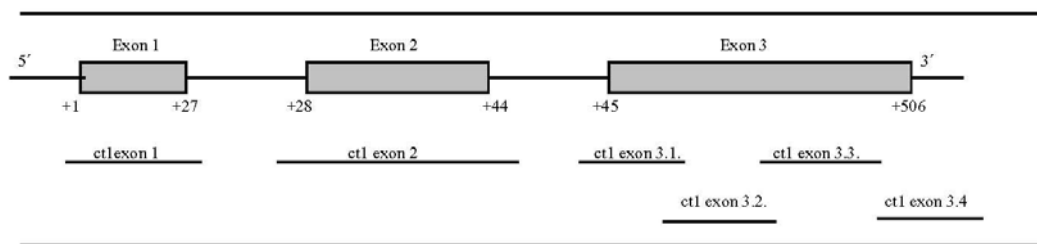


Abb. 10: Aufbau des humanen Cardiotrophin-1-Gens. Es handelt sich um eine nicht-maßstabgerechte Darstellung. Die Größe der Introns ist unbekannt. Schematisch dargestellt ist außerdem die ungefähre Lage der PCR-Fragmente.

3.3.1 Variante an der Position +274 im Codon 92

Die SSCP-Analyse des Fragmentes "ctl exon 3.2." wies ein variantes Laufverhalten bei Raumtemperatur und 4°C auf, das insgesamt bei zwei Patienten nachweisbar war. Die Charakterisierung dieser Variante ergab einen Einzelbasenaustausch G→A an der Position +274. Da diese Veränderung der DNA-Sequenz weder eine bestehende Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym zerstört noch eine neue bildet, wurde für den weiteren Nachweis und die Genotypisierung aller untersuchten Patienten ein ACRS-Assay (Amplification Created Restriction Site-Assay) notwendig. Hierfür wurde mit Hilfe des "mismatch"-Primers "ctlmodF" (Tab. 20 bis 22) an der Position +271 eine zusätzliche Variante (G→T) so eingefügt, daß bei Vorhandensein der Mutation eine Restriktionsstelle für die Endonuklease *TaqI* gebildet wird. Als

Rückwärts-Primer diente der neu synthetisierte Primer "ct1 mod R". Dadurch entstand ein PCR-Fragment von 171 bp Länge.

Das Wildtyp-Allel wird vom Enzym nicht geschnitten. Im Polyacrylamid-Gel stellt sich daher nur eine Bande von 171 bp dar. Beim Vorliegen des mutierten Allels wird das PCR-Produkt in zwei Fragmente von 156 bp und 15 bp geschnitten. Aufgrund der Kürze des letzteren Fragmentes und der daraus resultierenden geringen DNA-Menge läßt sich dieses nicht in der Gelelektrophorese darstellen. Daraus folgt, daß Patienten, die heterozygot für die Mutation sind, zwei Banden von 171 bzw. 156 bp aufweisen. Homozygote Patienten würden nur eine Bande von 156 bp besitzen.

Durch die Genotypisierung aller Patienten konnte die Mutation bei jeweils einem Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie respektive Hypertropher Kardiomyopathie bestätigt werden. Bei beiden Personen lag die heterozygote Form vor. Keine der Kontrollpersonen wies diese Variante auf.

Durch die Basenpaarsubstitution im Codon 92 kommt es zu einer Veränderung des Tripletcodes durch die im transkribierten Protein ein Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin erfolgt.

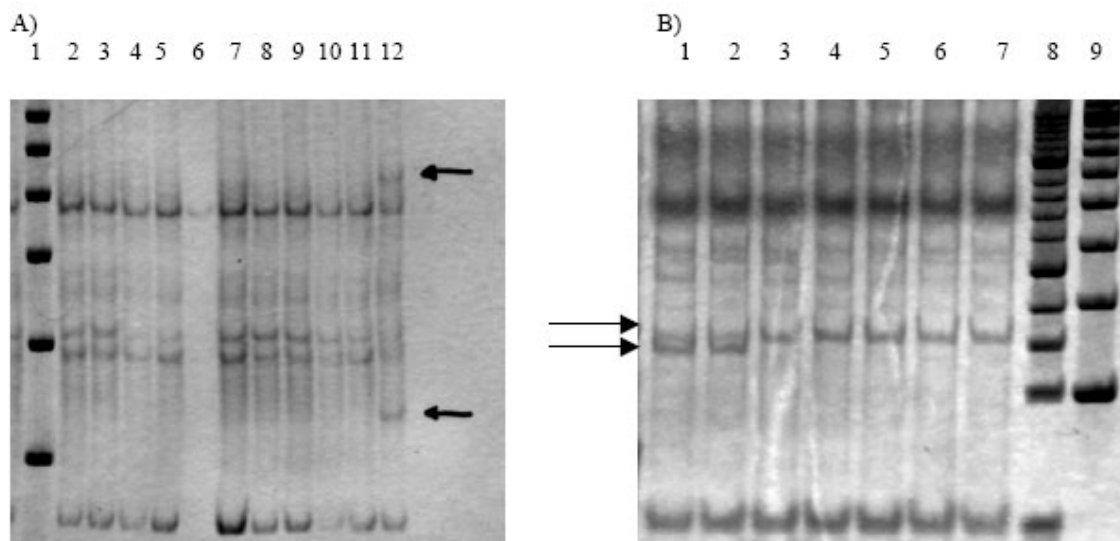


Abb. 11: **A)** Darstellung des aberranten Laufverhaltens des HCM-Patienten mit der G274A-Mutation im Codon 92 in der SSCP bei 4°C. Es zeigten sich zwei zusätzliche Banden (Pfeile). Spur 1: Marker, Spuren 2-11: Patienten mit gleichem Laufverhalten (Wildtyp), Spur 12: HCM-Patient mit abweichendem Muster **B)** RFLP mit *Taq I*. Spur 1: DCM-Patient mit Mutation, Spur 2: HCM-Patient mit Mutation, Spuren 3-7: Patienten mit Wildtyp, Spuren 8+9: Marker. Zu erkennen sind zwei Banden (entsprechend 171 und 156 bp, Pfeile) bei beiden Mutationsträgern (heterozygot). Alle übrigen Patienten weisen wie erwartet nur eine Bande bei 171 bp auf.

Tab. 26: Klinische und funktionelle Parameter der Patienten mit der G274A-Mutation im Codon 92 des humanen CT-1-Gens

	Patient 1	Patient 2
Geschlecht	männlich	männlich
Alter (Jahre)	52	67
Hauptdiagnose	DCM	HOCM
Nebendiagnosen	Nierenarterienstenose li., Adipositas, Hyperurikämie, Hyperlipoproteinämie	Hyperlipoproteinämie, kompensierte Niereninsuffizienz
Klinik/Verlauf	Rhythmusstörungen LOWN V, rezidivierende Dekompensationen, NYHA III-IV	Vorhofflimmern, Z.n. Septalastembolisation, intraventrikulärer Gradient von 100 mmHg, AV-Block I°, NYHA II-III
Familienanamnese	negativ	negativ (Kinder untersucht)
LVEF	20-40 % (rezidiv. Dekomp.)	65 %
Septumdicke (mm)	12	21
LVEDD (mm)	83-55 (rezidiv. Dekomp.)	45

3.4 Varianten innerhalb der 5'-flankierenden Region des humanen Cardiotrophin-1 Gens

Die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des Genome Walker Kits ermittelte Sequenz für den 5'-flankierenden Bereich des humanen Cardiotrophin-1 Gens diente als Grundlage für die systematische PCR-SSCP-Analyse dieser Region hinsichtlich möglicher Varianten. Dazu wurden 1071 bp mittels 7 überlappender PCR-Fragmente (ct1Prom1, ct1rep, ct1gap2, ct1gap3, ct1gap4, ct1gap5, ct1gap6) untersucht.

Es konnte ein Polymorphismus detektiert werden, der nachfolgend bezüglich seiner Charakteristika beschrieben wird.

3.4.1 Polymorphismus an der Position -130

Die SSCP-Analyse ergab für das Fragment "ct1gap6" ein abweichendes Laufverhalten bei 4°C. Durch die anschließende Sequenzierung konnte ein Basenaustausch von G→T an der Position -130 bestätigt werden. Auch hier war die Anwendung eines ACRS-Assays notwendig. Dazu wurde ein Vorwärts-Primer "ctaMnII" (Tab. 20) synthetisiert, durch den zwischen den Positionen -132 und -133 ein zusätzliches G inseriert wird. Im komplementären Strang resultiert daraus ein C, wodurch eine dritte Schnittstelle für das Restriktionsenzym Mnl I (5'-CCTC(N)₇[↓]...3') vervollständigt wird. Bei Vorliegen der Mutation ist diese Erkennungssequenz zerstört, da durch die Substitution G→T das zweite C durch ein A ersetzt wird. Daraus resultiert, daß die Wildtyp-DNA in 4 Fragmente von 15, 29, 37 und 104 bp geschnitten wird, wobei nur das Längste im Gel sichtbar ist. Das mutierte Allel wiederum besitzt nur zwei Schnittstellen, so daß nach dem Restriktionsverdau Fragmente mit den Längen 29, 37 und 119 bp vorliegen. Heterozygote Patienten weisen demzufolge zwei Banden der Längen 104 und 119 bp auf.

Innerhalb des ursprünglichen Patientenkollektivs zeigte sich eine Tendenz zu einem höheren Vorkommen innerhalb der DCM-Gruppe. Daher wurde die Gruppe der Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie auf 201 und die der Kontrollpersonen auf 217 erhöht. Insgesamt zeigte die Genotypisierung das Vorliegen dieser Variante in 10 DCM-Patienten (Allelfrequenz: 2,5 %), 1 HCM-Patient (0,9 %, n=53) und 3 Kontrollpersonen (0,7 %). Bei jedem dieser Patienten lag die heterozygote Form vor (Tab. 27). Es konnten somit keine homozygoten Patienten identifiziert werden. Dies könnte einerseits an dem insgesamt seltenen Auftreten der Variante (1,49 % im Gesamtkollektiv) oder andererseits an einem Ungleichgewicht der Genotypfrequenzen liegen. Ursache hierfür könnte eine erhöhte Letalität homozygoter Merkmalsträger sein. Diese Theorie läßt sich mit dem Hardy-Weinberggesetz überprüfen. Bei Vorliegen zweier Allele A und B mit den Allelfrequenzen p und q in einer idealen Population (freie Partnerwahl; keine Selektion oder Migration) gilt:

$$p+q=1 \text{ (100\%)}$$

Hardy und Weinberg beschrieben 1908 unabhängig voneinander eine feste Beziehung zwischen den Allel- und Genotypfrequenzen als:

$$p^2+2pq+q^2=1 \text{ (Hardy-Weinberg-Gesetz).}$$

Die in dieser Arbeit beobachteten Genotyphäufigkeiten innerhalb der einzelnen Patientengruppen zeigten keine signifikanten Abweichungen zu den erwarteten Frequenzen (Tab. 27). Das insgesamt seltene Vorkommen der Variante ist somit die Ursache für die fehlende Identifizierung homozygoter Patienten. Es müßten insgesamt 4505 Personen genetisch untersucht werden, um eine Person zu finden, die homozygot für den beschriebenen Polymorphismus ist.

Ein Vergleich der Allelfrequenzen zeigt eine Tendenz zum häufigeren Auftreten des Polymorphismus in der Gruppe der DCM-Patienten. Die statistische Analyse nach dem Chi-Quadrat-Test für alle drei Gruppen gemeinsam ergab, daß dieser Unterschied nicht auf dem Niveau von $p=0,05$ signifikant ist. Der direkte Vergleich der DCM-Patienten mit den Kontrollen zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Tabellen 28, 29).

Tab. 27: Gegenüberstellung der nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten und in dieser Arbeit beobachteten Genotypfrequenzen für den identifizierten Polymorphismus (G->T). GG=Wildtyp, GT=Heterozygot, TT=Homozygot für Variante. Der Chi-Quadrat-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied.

	GG		GT		TT		X ²	p
	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet	erwartet	beobachtet		
DCM	191,08	191	9,8	10	0,13	0	0,005	0,94
HCM	52	52	0,98	1	0,005	0	0,001	0,97
Kontrollen	213,97	214	3,02	3	0,01	0	0,002	0,97

Tab. 28: Chi-Quadrat-Test des Unterschieds der Allelfrequenzen aller drei Gruppen (DCM, HCM und Kontrollen) für die Basenpaarsubstitution G zu T an Position -130 der 5'-UTR (2 Freiheitsgrade).

	DCM	Kontrollen	HCM
Allel 1 (-130G)	392 (97,5)	431 (99,3)	105 (99,1)
Allel 2 (-130T)	10 (2,5)	3 (0,7)	1 (0,9)
CHI-Quadrat			4,8
p			0,09

(in Klammern: Angaben in Prozent).

Tab. 29: Chi-Quadrat-Test zum Vergleich der Allelfrequenzen der DCM-Patienten und Kontrollen (1 Freiheitsgrad, Yates-Korrektur).

	DCM	Kontrollen
Allel 1 (-130G)	392 (97,5)	431 (99,3)
Allel 2 (-130T)	10 (2,5)	3 (0,7)
CHI-Quadrat		3,3
p		0,07

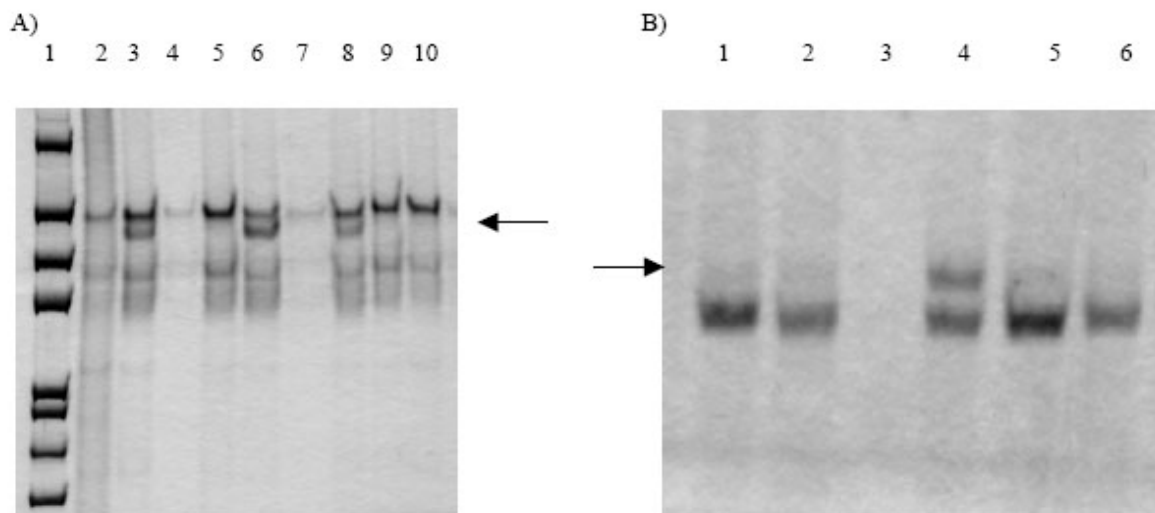


Abb. 12: A) SSCP-Gel mit Darstellung des aberranten Laufmusters bei drei Patienten (Spuren 3, 6 und 8) mit dem G zu T-Austausch an der Position -130 im Promotorfragment „ct1gap6“, Spur 1: Marker, Spuren 2,4,5,7,9,10: Patienten mit Wildtyp. B) Restriktionsverdau mit *MnlI*. Es zeigen sich zwei Banden (entsprechend 104 und 119 bp) bei einem heterozygoten Patienten mit dem Polymorphismus (Spur 4). Im Vergleich dazu weisen Patienten mit dem Wildtyp nur eine Bande mit 119 bp auf (Spuren 1,2,5,6)

In den folgenden Tabellen sind klinische Daten der Patienten dargestellt, die den Polymorphismus im Promotor des humanen CT-1-Gens aufweisen. Die Symptome, echokardiographischen Parameter sowie die erhobenen histologischen Charakteristika entsprechen im Wesentlichen dem typischen Verlauf dieser Erkrankungen. Auffällig ist allerdings, daß es sich bei allen DCM-Patienten vermutlich um eine sekundäre Form der Erkrankung handelt: 4 Patienten haben in der Anamnese einen Hinweis auf eine Myokarditis, von 3 Patienten wird ein Alkoholmißbrauch berichtet und bei den übrigen drei Patienten konnten Antikörper gegen den β -1-Rezeptor nachgewiesen werden. Der Patient mit der Hypertrophen Kardiomyopathie weist zusätzlich eine Insertion von 2 Basenpaaren im Myosin-Bindungsprotein auf, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führt.

Tab. 30: Anamnestische und klinische Daten aller Patienten, bei denen der Polymorphismus im Promotor nachgewiesen werden konnte (Tabelle und Erläuterungen siehe folgende Seite)

DNA-Num	Alter (Jahre)	Geschlecht	Diagnose	NYHA	mögliche Ursachen	FA	Nebendiagnosen	Biopsie
117	56	M	DCM, EF 22%, VF seit '93, Z.n. Kardioversion, ICD 2/2000	II	Beta1-AK, keine KHE, kein C2-Abusus	negativ	Z.n. Apoplex '94, Schlaf-Apnoe	95: kein Myokarditis Hinweis, mäßige Hypertrophie, keine Fibrose 2000: starke Hypertrophie, starke Fibrose, Z.n. Myokarditis mit schweren myokardialen
240	48	M	DCM, (ED 93), EF 21%, rezidivierende HRST bis Lown IVb, pHT, rezidivierende Dekompensationen	k.A.	Z.n. Myokarditis 1990	k.A.	aHTN, NI komp. Ret., Hyperurikämie, Chondrodysplasie li. Arm, steroidind. Osteoporose	k.A.
354	50	M	DCM (ED 82), EF 13 %, keine HRST, pHT, chronische Lungenstauung, rezidivierende Dekompensationen	III bis IV	chron. C2-Abusus, 27 J Uranabbau, kein KHE	k.A.	aHTN, NI kompensierte Retention, HLP, Hyperurikämie, Adipositas per magna	k.A.
359	55	M	DCM (ED Mitte 80), EF <30%, TAA bei VF, VT, ICD 5/94, rezidivierende Dekompensationen	II bis III	Z.n. Myokarditis, kein C2-Abusus	negativ	aHTN, pHT,	87: mäßige Hypertrophie, deutliche Fibrose, Lymphozyteninfiltrat, Z.n. Myokarditis mit geringer Restaktivität
376	66	W	DCM (ED 93), EF 32 %, Lown IVa, 2/2000 DDD-SM bei AVB 3°	III	ev. Myokarditis, keine KHE	k.A.	pHT, Colitis ulcerosa 4/90	93: leichte bis mittlere Hypertrophie, geringe Fibrose, vermehrt freie Zellen
391	59	M	DCM (ED 90), EF ca.20%, Lown IVb	II bis III	Beta1-AK	k.A.	Scharlach als Kind, schwere Grippe 86, Adipositas per magna, Hyperurikämie	k.A.
448	49	M	DCM (ED 96), EF ca. 15%, progrediente Dyspnoe seit 90, LSB	III	Z.n. Myokarditis 1973, beta1-AK	k.A.	Hyperurikämie, Diabetes mellitus II	k.A.
543	49	M	DCM (ED 91), EF 20 %, AVB °, inkompletter RSB/LSB, Z.n. Dekompensationen, 97: biventrikuläres Assist-Device, Tod 12/97	II bis III	C2-Abusus	negativ	pHT	Obduktion 97: Myozyten fleckförmig, unregelmäßige bizarre Kerne, feinetzige Fibrose, C2-toxische DCM
916	46	M	DCM (ED 96), EF 20%, rezidivierende Dekompensationen, Tod 6/98 akute Dekompensation	III	C2-Abusus	negativ	Diabetes mellitus, pHT, persistierendes Foramen ovale, Hyperurikämie	k.A.
953	58	M	DCM (ED 92), EF 20 %	III	Beta1-AK,	k.A.	aHTN, Nephrolithiasis, NI kompensierte Retention, IDDM, Z.n. Autonomen Adenom 92, Z.n. Apoplex 94, TVT 60	explantiertes Herz: hyper-, atrophe Myozyten, vergrößerte und pathologische Kerne, diffuse Fibrose, teilweise Narben, kein Infiltrat, keine Nekrose, Wand li. k.A.
314	64	M	HOCM (ED 86), VF, Lown IVb, ICD 4/98	II	2bp Insertion an Position +3126 im Myosin-Bindungsprotein C (Heterozygot)	k.A.	KHE 2G, Z.n. PTCA + Stent, aHTN, AS I°, MI I°, seit 86 chronischer Perikarderguß unklarer Genese, Z.n. TIA bei Carotisstenose beidseits 98, Adipositas per magna	k.A.

Tab. 31: Echoparameter der Patienten mit dem Promotorpolymorphismus

DNA-Nummer	IVS (ed)	HW (ed)	LV-EDD	LV-ESD	LV-EF	LV-FS	LA	RV-EDD	RV-EF	
117	8 mm	10 mm	80 mm	64 mm	k.A.	2%	46 mm	k.A.	k.A.	
240	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	21%	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
354	7 mm	11 mm	110 mm	99 mm	15%	6%	56 mm	15 mm	30%	
359	10 mm	8 mm	73 mm	63 mm	32%	14%	k.A.	23 mm	k.A.	
376	10 mm	10 mm	53 mm	29 mm	32%	45%	k.A.	normal	k.A.	
391	11 mm	10 mm	77 mm	69 mm	22%	11%	k.A.	30 mm	55%	
448	k.A.	k.A.	76 mm	67 mm	15%	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	
543	8 mm	7 mm	88 mm	80 mm	20%	10%	51 mm	36 mm	40%	
916	11 mm	10 mm	70 mm	69 mm	20%	11%	k.A.	34 mm	30%	
953	k.A.	k.A.	71 mm	61 mm	15%	12%	50 mm	k.A.	25%	
314	20 mm	8 mm	50 mm	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	normal	k.A.	Druckgrad. max. 49 mm HG

Tab. 32: Katheterdaten für Patient Nr. 240; LVEDVI=Linksventrikulärer Enddiastolischer Volumenindex, LVESVI=LV-Endsystolischer Volumenindex, SVI=Schlagvolumenindex, LVEF=LV-Ejektionsfraktion

DNA-Nummer	LVEDVI (ml/m2)	LVESVI (ml/m ²)	SVI (ml/m2)	LVEF (%)
240	74	20	54	74

IVS=Interventrikuläres Septum, HW=Hinterwand, ed=enddiastolisch, LV-EDD=Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser, LV-ESD=Linksventrikulärer Endsystolischer Durchmesser, LV-EF=Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, LV-FS=Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion, LA=Linker Vorhof (Durchmesser), RV-EDD=Rechtsventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser, RV-EF=Rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion k A =keine Angaben Für Pat Nr 240 waren keine Echodaten verfügbar

3.4.2 Variante an den Positionen -992 bis -995

Die Analyse des Fragmentes "ct1Prom1F/ct1prb" zeigte ein aberrantes Laufverhalten im SSCP-Gel bei 4 °C und bei Raumtemperatur für einen Patienten. Die Sequenzierung ergab eine Deletion von vier Basen an den Positionen -992 bis -995 (CTTT). Die weitere Verifizierung dieser Variante und das Screening aller Patienten erfolgte anschließend mittels RFLP-Fragmentlängen-Polymorphismus unter Verwendung des Enzyms "Eco I". Dessen spezifische Erkennungssequenz (5'..CTCTTC(N)₁[↓]..3') wurde durch die Deletion gebildet. Demzufolge blieb das Wildtyp-Allel unverändert (131 bp), während das mutierte Allel in zwei Fragmente mit den Längen von 75 und 59 bp geschnitten wurde. Heterozygote Patienten wiesen deshalb im Polyacrylamidgel drei Banden der Längen 131, 75 und 59 bp auf.

Die RFLP-Analyse aller Patienten wies diese Mutation bei nur einer Patientin mit HCM nach. Nähere klinische Daten waren retrospektiv nicht zu erheben, da die DNA der Patientin aus einer externen Klinik zur genetischen Analyse zugeschickt wurde. Die Patientin selbst stellte sich nicht im Deutschen Herzzentrum Berlin vor. Interessant ist allerdings, daß bei der gleichen Patientin zusätzlich eine stumme Mutation im Gen des Myosin-Bindungsprotein C identifiziert werden konnte.

Durch die hier gefundene Deletion wird keine der bisher identifizierten Transkriptionsfaktorbindungsstellen zerstört.

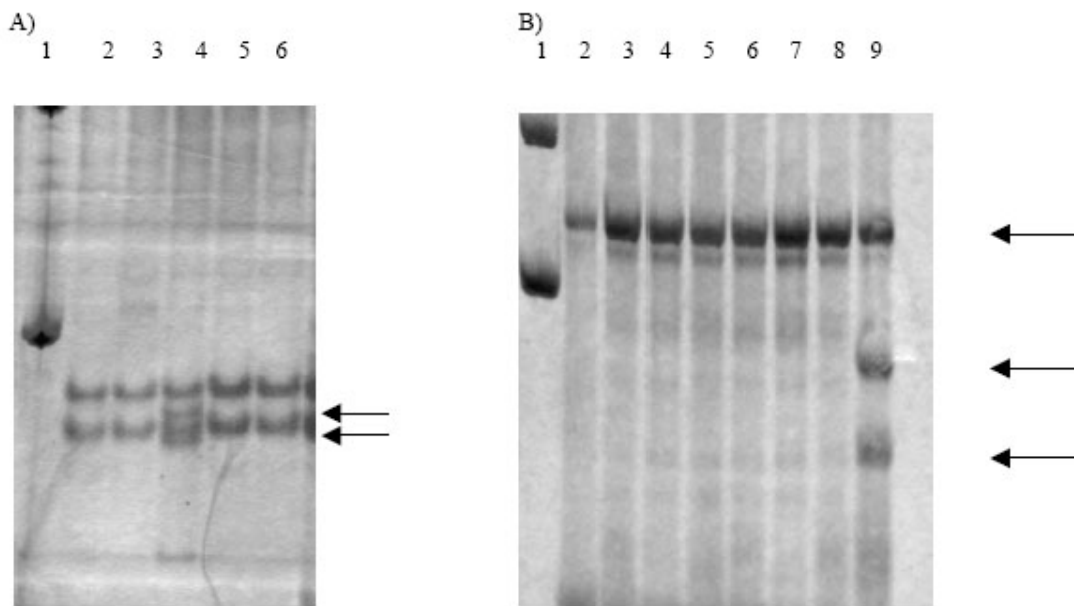


Abb. 13: **A)** Ausschnitt aus einem SSCP-Gel bei Raumtemperatur für das Promotorfragment „ct1Prom1F/ct1prb“. Es sind bei einer Patientin (Spur 4) zwei zusätzliche Banden zu erkennen. Spur 1: Marker, Spuren 2-3 + 5-6: Patienten mit Wildtyp. **B)** Restriktionsverdau mit *EarI*. Bei der Patientin mit der CTTT-Deletion (Spur 9) sind deutlich drei Banden (entsprechend 131, 75 und 59 bp, Pfeile) zu erkennen. Alle übrigen Patienten (Spuren 2-8) weisen wie erwartet nur eine Bande mit ca. 131 bp auf. Spur 1: Marker

3.5 CT-1 mRNA-Expression in menschlichem Myokardgewebe

3.5.1 CT-1 mRNA Quantifizierung

Nach erfolgter RNA-Isolierung und reverser Transkription wurde das Material jeder Probe als Doppelansatz in die PCR eingesetzt. Gleichzeitig erfolgte die Amplifikation des PDH-Gens in jeweils einem Ansatz für jede Probe. Alle Amplifikate wurden anschließend auf der gleichen Chromatographiesäule unter identischen Bedingungen quantifiziert. Für den anschließenden Vergleich der Daten untereinander wählten wir die maximale Höhe der Extinktionskurven. Dabei ergaben sich die in den folgenden Tabellen wiedergegebenen Werte.

Tab. 33: Ergebnisse der HPLC-Analyse der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (LVEF<40%).

Probe	CT 1 (Peakhöhen)	Mittelwert CT1	PDH	Quotient CT 1/PDH	Mittelwert Quotient
CHI 1	5469	6368	7297	0,75	0,87
	7267			1,00	
CHI 2	4415	5422	7604	0,58	0,71
	6428			0,85	
CHI 3	7867	8748	7454	1,06	1,17
	9629			1,29	
CHI 4	7869	8168	6859	1,15	1,19
	8466			1,23	
CHI 5	8107	6861	6297	1,29	1,09
	5615			0,89	
CHI 6	6501	6960	5822	1,12	1,20
	7419			1,27	

Die Quantifizierung der CT-1-mRNA erfolgte im Doppelansatz, die der PDH-mRNA als Einzelansatz je Probe. In die Auswertung ging jeweils nur die Höhe der HPLC-Peaks ein.

Tab. 34: Ergebnisse der HPLC-Analyse der Patienten mit normaler LVEF.

Probe	CT 1 (Peakhöhe)	Mittelwert CT1	PDH	Quotient CT1/PDH	Mittelwert Quotient
KO 1	6012	5678	7329	0,82	0,77
	5344			0,73	
KO 2	3763	4188	6715	0,56	0,62
	4613			0,69	
KO 3	1220	1620	5683	0,21	0,29
	2020			0,36	

Die Quantifizierung der CT-1-mRNA erfolgte im Doppelansatz, die der PDH-mRNA als Einzelansatz je Probe. In die Auswertung ging jeweils nur die Höhe der HPLC-Peaks ein. KO=Kontrolle

Tab. 35: Ergebnisse der HPLC-Analyse der Patienten nach Transplantation (LVEF>45%).

Probe	CT 1 (Peakhöhe)	Mittelwert CT1	PDH	Quotient CT 1/PDH	Mittelwert Quotient
TX 1	1394	2022	5886	0,24	0,34
	2650			0,45	
TX 2	6300	3329	7002	0,90	0,48
	358			0,05	
TX 3	4288	3544	6105	0,70	0,58
	2800			0,46	
TX 4	4370	5157	8638	0,51	0,60
	5944			0,69	
TX 5	4459	5624	6363	0,70	0,88
	6788			1,07	

Die Quantifizierung der CT-1-mRNA erfolgte im Doppelansatz, die der PDH-mRNA als Einzelansatz je Probe. In die Auswertung ging jeweils nur die Höhe der HPLC-Peaks ein. TX=Transplantat

Die Höhen der HPLC-Kurven für CT-1 lagen im Mittel bei 7088 ± 1398 für die Patienten mit reduzierter LVEF, bei 3829 ± 1720 für die Kontrollgruppe mit normaler LVEF und bei 3935 ± 2014 für die Gruppe der TX-Patienten. Dies entspricht einem relativen Anstieg der CT-1 mRNA um 85% (KO) bzw. 80% (TX).

Die Zusammenfassung der Daten beider Kontrollgruppen (KO und TX) resultiert in einem Mittelwert für die HPLC-höhe für CT-1 von 3895 ± 1910 . Daraus ergibt sich eine um 82 % höhere CT-1 Expression in der Gruppe mit chronischer Herzinsuffizienz (CHI).

Die 95 %-Konfidenzintervalle liegen zwischen 2571 und 5219 in der Kontrollgruppe (KO+TX) sowie zwischen 5969 und 8207 in der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten (CHI).

Zur internen Standardisierung diente die gleichzeitige Amplifikation des PDH-Gens. Dessen Menge blieb, wie vorher erwartet, unverändert in allen Probengruppen ($p=0,72$ für Expressionunterschied zwischen CHI und Kontrollgruppe). Die Werte lagen im Mittel bei 6889 ± 644 für die Patienten mit reduzierter LVEF, bei 6576 ± 679 bzw. 6799 ± 993 für die beiden Kontrollgruppen KO respektive TX.

Durch die Relation von CT-1 zu PDH wird die Differenz der mRNA-Expression zwischen den Patientengruppen bestätigt. Bei einem CT-1/PDH-Quotienten von $1,04 \pm 0,22$ für die Patienten mit Herzinsuffizienz bzw. von $0,57 \pm 0,26$ für die Kontrollen ergibt sich ein Anstieg um 82 %

($p < 0,002$). Es fand sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der beiden Kontrollgruppen (KO: $0,56 \pm 0,21$; TX: $0,58 \pm 0,29$, $p = 0,92$).

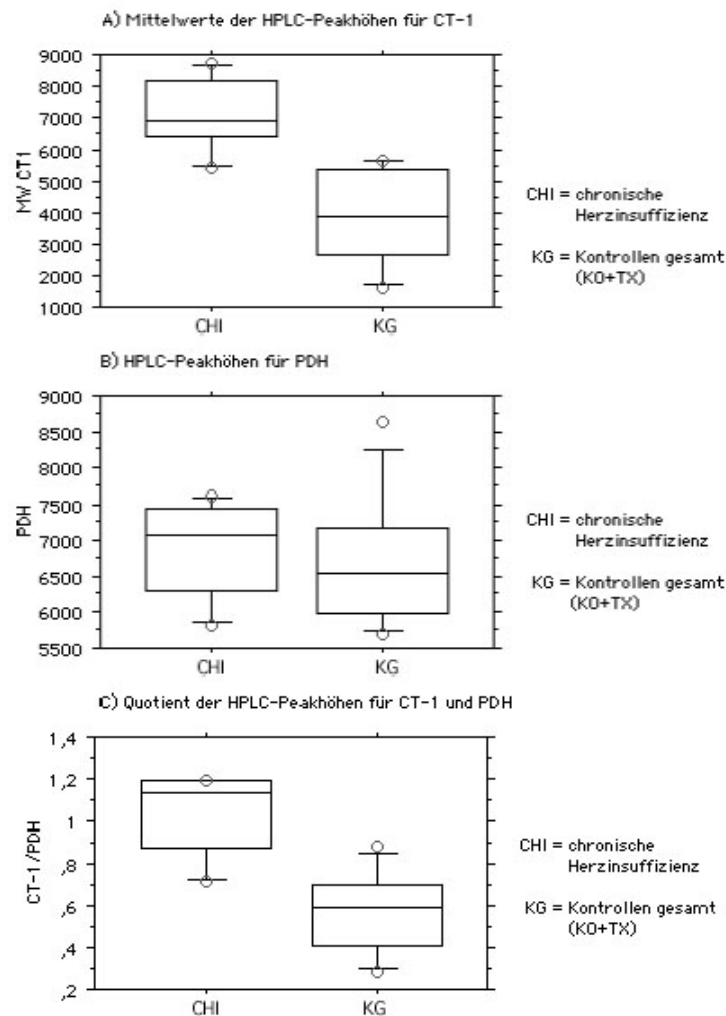


Abb. 14: Box-and-Whisker-Plot-Diagramme mit Darstellung der HPLC-Daten der mRNA-Quantifizierung für CT-1 und PDH. A): Mittelwertverteilung der HPLC-Peakhöhen für CT-1, B): Mittelwertverteilung der HPLC-Höhen für PDH, C): Verteilung der Quotienten aus CT-1 und PDH (relative mRNA-Expression). Zu erkennen sind eine höhere CT-1-Expression in der Patientengruppe mit Herzinsuffizienz sowie eine gleiche Expression der PDH-mRNA in beiden Gruppen (CHI vs. KO+TX). CHI: Patienten mit verminderter LVEF; Kontrollen: aufgrund der geringen Patientenzahlen wurden beide Subgruppen der Patienten nach Transplantation (TX) sowie der Patienten mit normaler LVEF (KO) zusammengefasst, Box-Plot: Werte innerhalb der Box liegen zwischen der 25%- und 75%-Quantile, waagerechte Linie in der Box entspricht dem Median, senkrechte Linien mit waagerechter Begrenzung (Whisker) entsprechen 5%- bzw. 95%-Quantile, außerhalb liegende Punkte entsprechen Extremwerten

3.5.2 Korrelation der CT-1 mRNA Expression mit der linksventrikulären Funktion

Die statistische Auswertung zeigte eine signifikante negative Korrelation zwischen der CT-1-Expression (Quotient CT-1/PDH) und der Links- bzw. Rechtsventrikulären Ejektionsfraktion. Darüberhinaus korreliert die CT-1-Expression signifikant mit weiteren linksventrikulären

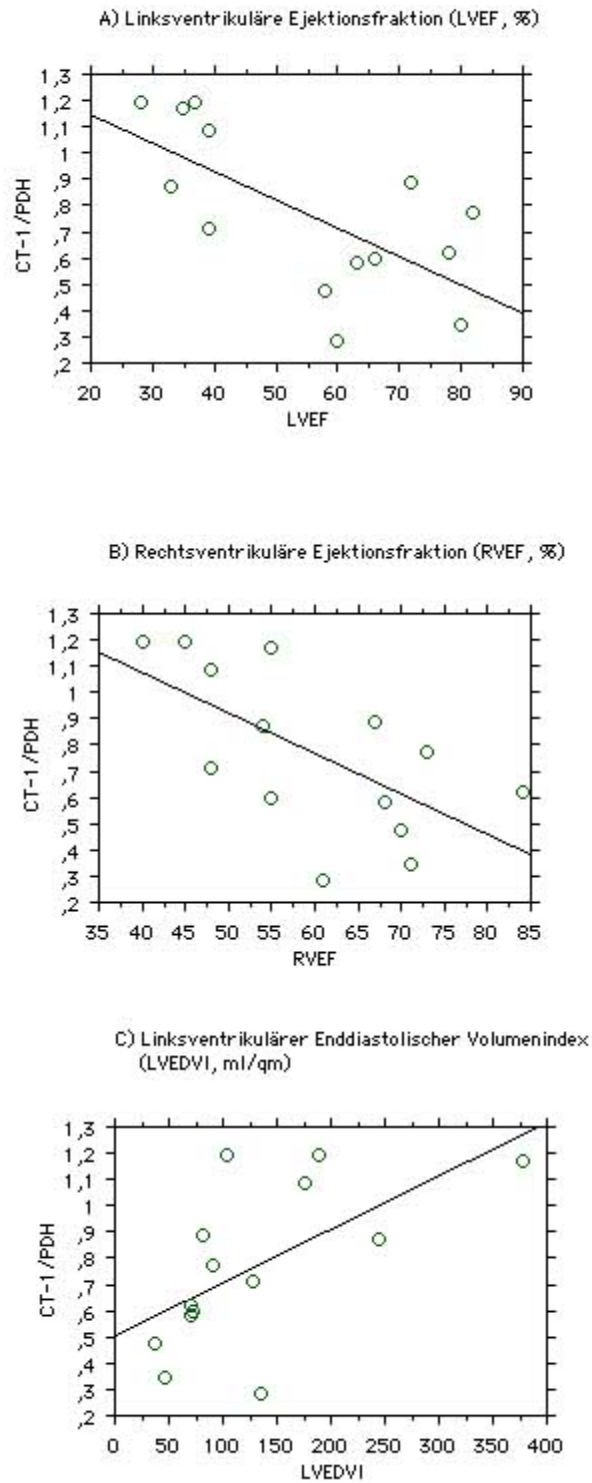
Funktionsparametern. So weisen Patienten mit einem hohen linksventrikulären enddiastolischem sowie endsystolischem Volumenindex (LVEDVI, LVESVI) und einem erhöhten linksventrikulären Masseindex (LVMI) eine signifikant höhere mRNA-Expression auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Korrelation zur enddiastolischen Muskeldicke (LVEDMD). Dies weist auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der CT-1-Expression und einer Verschlechterung der Pumpfunktion (LVEF, RVEF) sowie einer Zunahme der Ventrikeldilatation (LVEDVI, LVESVI) hin. Da der Masseindex die relative Muskeldicke im Verhältnis zur Ventrikeldilatation darstellt, besteht auch ein Hinweis auf einen Zusammenhang mit der Myokardhypertrophie.

Tab. 36: Korrelation der relativen CT-1-mRNA-Expression zu Funktionsparametern

Funktionsparameter	Korrelationskoeffizient	p-Wert	Z-Wert
LVEF	-0,67	0,007	-2,71
RVEF	-0,63	0,014	-2,46
LVEDVI	0,60	0,020	2,33
LVESVI	0,66	0,009	2,60
LVMI	0,63	0,014	2,45
LVEDMD	0,32	0,275	1,09

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Z-Test für Korrelation unter Verwendung des Computerprogramms StatView 4.5, **LVEF**: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, **RVEF**: Rechtsventrikuläre Ejektionsfraktion, **LVEDVI**: Linksventrikulärer enddiastolischer Volumenindex, **LVESVI**: Linksventrikulärer endsystolischer Volumenindex, **LVMI**: Linksventrikulärer Masseindex, **LVEDMD**: Linksventrikuläre enddiastolische Muskeldicke

Korrelation der CT-1 mRNA mit der kardialen Funktion



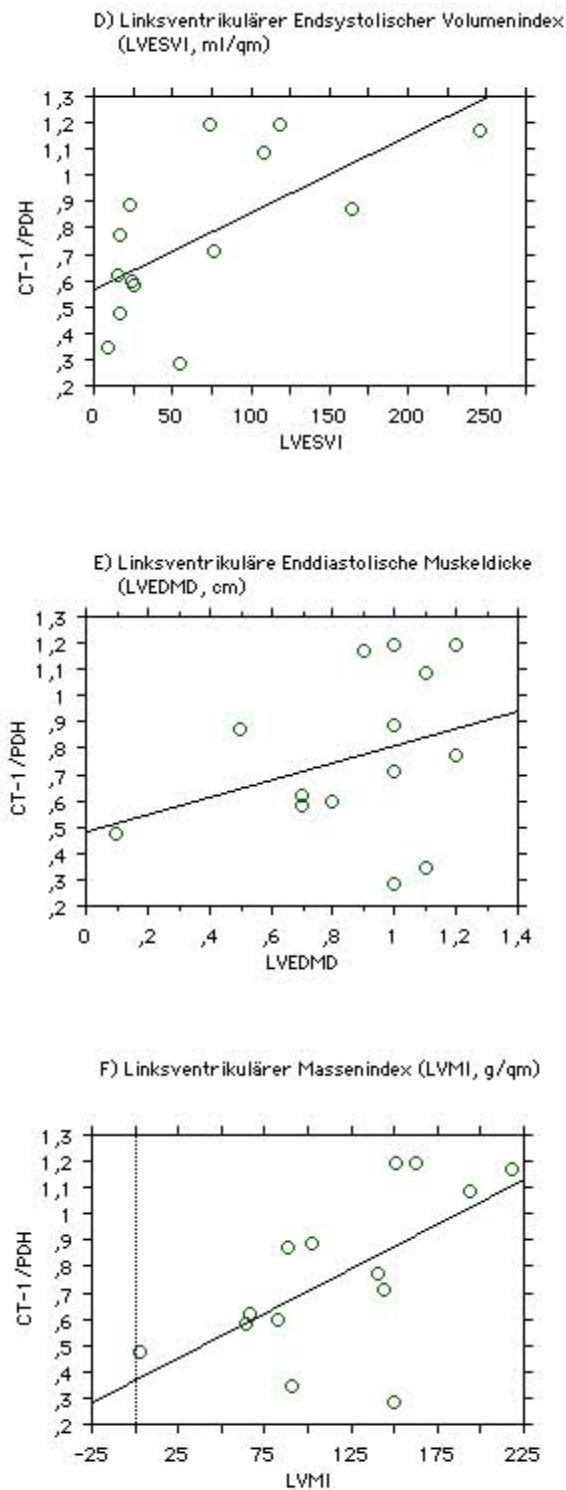


Abb. 15: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen kardialen Funktionsparametern und der relativen CT-1-Expression (CT-1/PDH). Zu erkennen ist eine negative Korrelation zwischen der links- und rechtsventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF, RVEF) sowie eine positive Korrelation mit den enddiastolischen und endsystolischen Volumenindizes (LVEDVI, LVESVI) und dem Masseindex (LVMI).

4 Diskussion

Für das Zytokin Cardiotrophin-1 konnten Wirkungen auf Hypertrophie und Apoptose von Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Da Kardiomyopathien durch eine gesteigerte Hypertrophie und Apoptose gekennzeichnet sind, könnten Varianten in regulatorischen und kodierenden DNA-Sequenzen des CT-1 Gens sowie Expressionsveränderungen der mRNA im Myokard an der Entwicklung dieser Erkrankungen beteiligt sein. Die Untersuchung dieser Hypothese erforderte einerseits die Aufklärung der Struktur und regulatorischen Funktion der 5'-untranslatierten Region (UTR), die Variantensuche in diesem Bereich sowie im Gen in unterschiedlichen Kohorten sowie die Messung der Expression der mRNA im menschlichen Myokard. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten die 5'-UTR als Promotor des CT-1 Gens identifiziert und Transkriptionsfaktorbindungsstellen nachgewiesen werden. Darüberhinaus fand sich eine Variante, die aufgrund eines Aminosäureaustausches funktionell relevant sein könnte sowie einen seltenen Polymorphismus, dessen pathogenetische Funktion noch unklar ist. Im Myokardgewebe herzinsuffizienter Patienten zeigten sich darüberhinaus mRNA Expressionsunterschiede, die mit klinischen Parametern korrelierten.

4.1 Die 5'-untranslatierte Region des humanen Cardiotrophin-1-Gens

4.1.1 Sequenzanalyse: Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren

Mit Hilfe des Genome Walker Kits (Clontech) konnten 1.1 kb der 5'-flankierenden Region des menschlichen CT-1-Gens kloniert und sequenziert werden. Der CT-1-Promotor weist einige Merkmale der Promotoren von sogenannten „housekeeping-genen“ auf, z.B. fehlt eine TATA-Box (siehe unten). Zusätzlich weist er sehr viele GC-Basenpaare auf. Promotoren der sogenannten "*housekeeping-genes*" besitzen viele CpG-Inseln, die unmethyliert sind. Der Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide bestimmt die Zugänglichkeit der Konsensussequenzen für die Transkriptionsfaktoren und somit die Aktivität des Promotors. So sind die entsprechenden Stellen in den Promotoren inaktiver Gene methyliert [Knippers, 1990].

In den meisten der bisher analysierten Fälle erfolgt der Transkriptionsstart eukaryoter Gene an der sogenannten TATA-Box nach Bindung verschiedener Faktoren inklusive der Polymerase II. Diese TATA-Box weist eine relativ konservierte räumliche Lokalisation 25-30 bp stromaufwärts

des Startkodons auf [Lewin, 2000]. Die in dieser Arbeit identifizierte Promotorregion enthält kein TATA-ähnliches Element und gehört damit zu den sogenannten "TATA-losten" Promotoren. Zu dieser Gruppe gehören nur wenige Gene, die z.B. für die normalen Zellfunktionen zuständig sind (Housekeeping Gene). Die Mechanismen, die in diesen Fällen zum Transkriptionsstart führen, sind noch ungeklärt. Es scheinen mehrere Startpunkte und zusätzliche Faktoren dabei involviert zu sein.

Unabhängig davon konnten im CT-1-Promotor verschiedene Bindungsstellen für ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. So befinden sich an den Positionen -1043 und -976 zwei CAAT-Elemente. Diese Konsensussequenzen wirken in unterschiedlichen Entfernungen zum Startpunkt und in 5' → 3'- sowie 3' → 5'- Orientierung. Sie scheinen eher die Effizienz des Promotors zu erhöhen und die Initiationsfrequenzen zu beeinflussen, als die Spezifität zu bestimmen [Lewin, 2000]. Es werden zwei Typen unterschieden, die CCAAT- und die GCAAT-Boxen, die von verschiedenen strukturell unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Zum Beispiel bindet ACF (ATP-dependent chromatin assembly and remodelling factor) bevorzugt an CCAAT-Sequenzen und C/EBP (CAAT/Enhancer binding protein) an GCAAT-Sequenzen. Letzterer Faktor ist ein weit verbreiteter Aktivator der Transkription *in vitro* und *in vivo* und kann unter anderem die IL-6-Expression stimulieren [Akira, 1990]. Darüber hinaus wurde in embryonalem Gewebe ein weiteres Protein identifiziert, das an CAAT-Elemente bindet. Dieses wird als CDP für "CAAT-displacement protein" bezeichnet und verhindert das Erkennen der CAAT-Box durch die Transkriptionsfaktoren [Lewin, 2000]. Im CT-1- Promotor befindet sich an der Position -1043 eine CCAAT- und an Position -976 eine GCAAT-Box.

Für die Effizienz eines Promotors sind vermutlich ein oder mehrere CAAT- und sogenannte GC-Boxen notwendig. Letztere werden, im Gegensatz zu ersteren, nur von einem Faktor, dem SP1-Protein erkannt. Häufig finden sich mehrere Kopien in beiden Orientierungen. Der CT-1-Promotor weist nur an der Position -580 eine GC-Box mit der Sequenz "GGGCGG" auf. SP1 bindet an einen DNA-Strang in einer 20 bp langen Region, die mindestens eine 6bp GC-Box enthält. Normalerweise kann dieser Faktor die Transkription nur stimulieren, wenn er nahe des Startpunktes bindet. Courey et al. [Courey, 1989] konnten aber zeigen, daß distal und proximal gebundene SP1-Proteine synergistisch die Transkription positiv beeinflussen. In TATA-losten Promotoren hilft SP1 dabei, den Faktor TFII-D (Initiationskomplex) an der richtigen Stelle im Bereich des Transkriptionsstarts zu platzieren [Knippers, 1990].

An der Position -984 beginnt die Konsensussequenz "TTNCNNNAA", die von STAT-Proteinen erkannt wird [Fukuzawa, 2000]. Diese cytoplasmatischen Proteine fungieren als

Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren (signal transducer and activator of transcription=STAT), die anschließend an die Rezeptorbindung verschiedener Liganden, darunter auch der IL-6-Zytokine, aktiviert werden, homo-bzw. heterodimerisieren und im Zellkern an die entsprechenden DNA-Sequenzen binden [Horvath, 1997]. STATs sind, wie bereits im Kapitel 1.2.3. beschrieben, auch an der CT-1-induzierten Signaltransduktion beteiligt. Das Vorhandensein einer STAT-Bindungsstelle im Promotor von CT-1 weist auf eine mögliche Aktivierung von CT-1 durch z.B. andere IL-6-Mitglieder oder einen eventuell vorhandenen Rückkopplungsmechanismus hin.

Zusätzlich befindet sich an der Position -639 ein cAMP-responsives Element (CRE), das die Transkription unterschiedlich reguliert. Ursprünglich wurde es als Enhancer solcher Gene identifiziert, die infolge erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel transkribiert werden. CRE's finden sich in verschiedenen Genen des Zellwachstums, wie z.B. "cFOS". Erkannt wird diese Konsensussequenz durch CRE-bindende Proteine (CREB), die als Homo- bzw. Heterodimere zusammen mit anderen Mitgliedern der CREB/ATF und AP1-Familie an die DNA binden. In den meisten Zellen wird CREB ständig exprimiert. Die Transkriptionsaktivität wird über die Phosphorylierung eines Serinrestes in der Transaktivierungsdomäne reguliert. Die Aktivierung erfolgt durch die Proteinkinase A, die Kalzium-Kalmodulin-abhängigen Kinasen II und IV und durch MAP-Kinasen. Unphosphoryliert kann CREB zwar an die DNA binden, bleibt dabei aber inaktiv. Nach der Aktivierung können weitere Co-Aktivatoren binden, durch die die Transkription verstärkt wird [Wegner, 2000]. Darüberhinaus kann als Splicevariante das Protein CREM (CRE-Modulierungsprotein) entstehen, durch das das CRE-Element blockiert wird. CREB ist ein wichtiger Regulator der Genexpression in Kardiomyozyten. Fenske et al. [Fentzke, 1998] zeigten im transgenen Tiermodell, daß Mäuse mit einer dominant-negativen CREB-Form eine dilatative Kardiomyopathie entwickelten, die der menschlichen Form ähnelte und durch atrophische sowie hypertrophische Fasern und eine interstitielle Fibrose gekennzeichnet war. Diese Ergebnisse unterstreichen auch die kardiale Bedeutung von Cardiotrophin-1.

Die CT-1-Promotorsequenz weist an der Position -484 ein GATA-Motiv auf. Dieses wird durch eine Gruppe strukturell ähnlicher Proteine erkannt, den GATA-Bindungsfaktoren, die jeweils ein oder mehrere Zink-Finger-Motive der Form "CXNCX(17)CXNCX" enthalten [Evans, 1988]. GATA-Faktoren sind an der Differenzierung und Genexpression zahlreicher Zelltypen beteiligt. Darunter befinden sich auch solche Gene, die für die myokardiale Differenzierung und Funktion wichtig sind, wie zum Beispiel Troponin C, die schwere Kette des kardialen alpha-Myosin und BNP (braintype natriuretic factor) [Huang, 1997; Grepin, 1994; Ip, 1994]. Die GATA-Faktoren werden in 2 Subgruppen unterteilt. Danach werden die Faktoren GATA-1 bis 3 hauptsächlich in

Zellen der Hämatopoese und des ektodermalen Gewebes und die Faktoren 4 bis 6 im Herz und in endodermalen Geweben exprimiert. Laverriere et al [**Laverriere, 1994**] zeigten eine frühe Expression von GATA-4 bis 6 in der Organentwicklung insbesondere des Herzens. Kuo et al [**Kuo, 1997**] inaktivierten GATA-4 im Mausmodell. Dies resultierte in einer Unfähigkeit der Promyokardiozyten zur ventralen Mittellinie zu migrieren. In Folge dessen war die weitere kardiale Entwicklung erheblich gestört; die Tiere waren nicht lebensfähig. Zusammengefaßt weisen diese Ergebnisse auch auf die mögliche Beteiligung von Cardiotrophin-1 an der Kardiogenese hin.

Insgesamt befinden sich neun AP-2-ähnliche Bindungsstellen an den Positionen -716, -438, -266, -251, -248, -207, -181, -73 und -72. Das Aktivator-Protein 2 (AP 2) ist ein Kernprotein, das initial aufgrund seiner Wechselwirkungen mit regulatorischen DNA-Sequenzen des Semian-Virus 40 (SV 40) identifiziert wurde. Während der Embryogenese ist es unter anderem in neuronalen Vorläuferzellen und in den frühen Extremitätenanlagen exprimiert [**Solway, 1998**]. Auch CT-1 konnte in diesen Geweben in frühen embryonalen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Desweiteren wird für AP 2 angenommen, daß es ein intermediäres Signalprotein der c-AMP-vermittelten Signaltransduktion darstellt [**Walton, 1990**].

An der Position -619 konnte eine AP1 (Aktivator protein)-Bindungsstelle identifiziert werden. AP1 besteht aus den Untereinheiten FOS und JUN, zwei Proteine, deren Gene zu den "immediate early genes" gehören und z. B. im Rahmen einer Myokardhypertrophie vermehrt exprimiert werden. Diese Proteine weisen eine basische, Lysin- und Arginin-reiche Region sowie einen sogenannten Leuzin-Zipper auf. Letzterer enthält einen Leuzin-Rest an jeder 7. Stelle und ist für die DNA-Bindung verantwortlich. Durch die Bindung von AP1 wird die DNA gebeugt. Dadurch nähert sich dieser Komplex wahrscheinlich an den Initiationskomplex an und ist demzufolge womöglich am Aufbau oder der Aktivierung dieses Komplexes beteiligt [**Knippers, 1990**]. Die verschiedenen Proteine der JUN- und FOS-Familien können durch eine Vielzahl an Stimuli exprimiert werden. Ihnen wird eine Rolle in der Regulation der Proliferation und der Differenzierung von Zellen sowie bei Reaktionen auf Zellschädigungen und auch bei der Apoptose zugeschrieben [**Wegner, 2000**].

Nach der Veröffentlichung der in dieser Arbeit ermittelten Promotorsequenz des humanen CT-1-Gens klonierten und charakterisierten Funamoto et al. [**Funamoto, 2000b**] 2.2kb der 5'-flankierenden Sequenz des CT-1-Gens der Maus. Auch dieser Bereich besitzt Promotoraktivität. Interessanterweise finden sich die oben beschriebenen Konsensussequenzen auch im Promotor der Maus wieder, der eine 55%ige Sequenzhomologie zu dem des Menschen aufweist.

Zusätzlich konnten weitere Transkriptionsfaktorbindungsstellen für Nkx2.5, GATA, MyoD, NF-IL6, CREB, AP3, P53 und HIF-1 identifiziert werden.

Der Vergleich mit dem Promotor des IL-6-Gens zeigt, daß sich die CT-1-Regulation wesentlich von der des IL-6-Gens unterscheidet. IL-6 besitzt eine TATA-Box sowie Bindungsstellen für NF- κ B und NF-IL6. Letztere sind an der Expression von IL-6 bei Hypoxie beteiligt [Matsui, 1999]. Obwohl CT-1 zur gleichen Zytokinfamilie gehört, fanden sich in den bisher analysierten CT-1-Promotorsequenzen weder TATA-Box noch NF- κ B-Elemente. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß CT-1 im Gegensatz zu IL-6, zu den Haushaltsgenen gehört, die ständig exprimiert werden und deren Kennzeichen unter anderem TATA-lose Promotoren sind.

Eine Untersuchung der Promotorregion des menschlichen Pro- α 1-Kollagen Gens [Vergeer, 2000] zeigte, daß einige Transkriptionsfaktoren wie SP1 und Ap2 nicht an alle potentielle Bindungsstellen binden. Demgegenüber deckte die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie die Bindung obiger Faktoren an DNA-stellen auf, die vorher nicht als potentielle regulatorische Regionen identifiziert wurden. Die alleinige Analyse einer Promotorsequenz ist also nicht ausreichend, um regulatorische Elemente eines Gens zu identifizieren. Dafür sind zusätzliche in vitro und in vivo Funktionsanalysen notwendig.

4.1.2 Die regulatorische Funktion des Promotors des humanen CT-1-Gens

Für die gesamte 1,1 kb große 5'-flankierende Region des CT-1-Gens konnte eine signifikante Promotoraktivität nachgewiesen werden. Der Vergleich der Aktivitäten wies dabei darauf hin, daß der gesamte Bereich zwischen den Positionen -1091 und -218 die Expression des Cardiotrophin-1 Promotors negativ beeinflusst. Hierbei könnte sich zwischen den Positionen -1091 und -739 ein Suppressorelement befinden. In der Tat liegen in diesem Bereich sowohl eine CCAAT- als auch eine GCAAT-Box. Für diese *cis*-aktiven Elemente konnte eine Expressions-suppression durch das sogenannte „CAAT-displacement-Protein“ (CDP) beschrieben werden [Lewin, 2000]. Der Bereich zwischen -739 und -218 könnte ebenfalls ein Suppressorelement enthalten, da die Aktivität nach der Deletion dieses Bereiches anstieg. Durch die TRANSFAC-Analyse konnte ein cAMP-Responsives Element (CREB) und ein GATA-Motiv in dieser Region identifizieren. Transkriptionsfaktorbindungsstellen können von verschiedenen *trans*-aktiven Faktoren erkannt werden, die die Expression des regulierten Genes

negativ oder positiv beeinflussen können [Lewin, 2000]. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für den CT-1 Promotor denkbar.

Das Konstrukt CT4 weist im Vergleich mit CT5 nur eine geringfügig höhere Promotoraktivität auf. Dies kann daran liegen, daß das hier liegende GATA-Element nur zellspezifisch aktiviert wird oder nur im Zusammenhang mit weiter stromaufwärts liegenden Faktoren die Transkription beeinflusst.

Der Bereich zwischen -577 und -739 scheint ebenfalls einen Enhancerbereich zu besitzen, da das entsprechende Konstrukt (CT3) nach CT6 die höchste Aktivität aufweist. In der Tat lassen sich hier mehrere Transkriptionsfaktorbindungsstellen nachweisen. Dies sind die SP1-site an Position -582, das AP1-Element bei -619, das cAMP-responsive Element (CRE) bei -639 und ein weiteres AP2-Element an Position -716. AP1 und SP1 sind unter anderem an der Aktivierung des Initiationskomplexes beteiligt. AP1 konnte als Bestandteil einiger Enhancer gefunden werden, wie z.B. des Virus SV40 [Evans, 1988]. CREB wirkt als Enhancer und AP-2 vermutlich als Vermittler in Genen, die durch einen erhöhten cAMP-Spiegel vermehrt transkribiert werden. Somit könnte auch die CT-1-Expression unter anderem einer cAMP-abhängigen Regulation unterliegen.

Generell ist die Aktivität vieler Enhancer-Elemente wesentlich vom jeweiligen Zelltyp und vom Bedarf des exprimierten Proteins abhängig. Auch die CT-1-Expression wird durch verschiedene Stimuli verstärkt, wie z.B. Hypoxie oder Angiotensin II (siehe Kapitel 1). Funamoto et al. [Funamoto, 2000b] identifizierten und analysierten den CT-1-Promotor der Maus und konnten zeigen, daß dieser über den hier vorgestellten Bereich des humanen Gens hinausgeht und weitere Elemente enthält. Auch für den humanen Cardiotrophin-1-Promotor sind weitere stromaufwärts liegende regulatorische Elemente vorstellbar. Durch zusätzliche Studien müssen diese identifiziert und die Bedeutung aller Elemente in unterschiedlichen Zelltypen, in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli sowie der räumlichen Lage zueinander analysiert werden. Daraus könnten sich wichtige Aufschlüsse über die Regulation von CT-1 und dessen Bedeutung in vivo ergeben.

4.2 Genetische Variabilität im kodierenden und regulatorischen Bereich des humanen Cardiotrophin-1-Gens und ihre mögliche Bedeutung in der Ätiologie von Kardiomyopathien

Die beiden häufigsten Formen der Kardiomyopathien, die DCM sowie die HCM, werden in bis zu 30% respektive 50% der Fälle mit monogenen Mutationen in Zusammenhang gebracht. Diese betreffen hauptsächlich Proteine des Sarkomers und des Zytoskeletts. Es wird angenommen, daß Mutationen in Proteinen, die die Kraftentwicklung des Sarkomers beeinflussen, zur HCM führen. Andererseits scheint sich eine DCM zu entwickeln, wenn Proteine, die für die Stabilität der Zellmembran bzw. die Kraftübertragung verantwortlich sind, verändert werden [Chen, 1999]. Neuere Untersuchungen von Kamisago et al [Kamisago, 2000] zeigten, daß auch Mutationen in Sarkomerproteinen, sprich β -MHC und Troponin-T, zur Entwicklung einer DCM führen können. Dies verschärft die Unklarheit über die Pathogenese der Kardiomyopathien. Selbst bei identischen Mutationen innerhalb der gleichen oder bei verschiedenen Familien finden sich eine unterschiedliche Penetranz und teilweise voneinander abweichende Phänotypen. Außerdem zeigte ein Hamstermodell, daß eine Deletion im δ -Sarkoglykangen, einem Protein des Dystrophin-Glykoproteinkomplexes, sowohl eine DCM als auch eine HCM verursachen kann. Dies hing vom jeweiligen genetischen Hintergrund ab [Sakamoto, 1997]. Beim Menschen kann eine Mutation im α -Aktin-Gen je nach Lokalisation zur Entwicklung einer DCM oder HCM führen [Olson, 1998; Mogensen, 1999]. Darüberhinaus ist im Tiermodell sowie bei einzelnen Patienten ein Übergang von einer Hypertrophie in eine Dilatative Kardiomyopathieform beschrieben worden [Freeman, 2001]. Kürzlich konnten Mogensen et al. zeigen, daß eine Mutation im Troponin I innerhalb einer Familie sowohl zur Restriktiven als auch zur Hypertrophie Kardiomyopathie führt [Mogensen, 2003]. Für die Ausprägung des Phänotyps scheinen also eine Variabilität in weiteren Genen und/oder verschiedene Umweltfaktoren von Bedeutung zu sein.

Transgene Tiermodelle konnten zum Beispiel zeigen, daß die Inaktivierung bzw. Überexpression von Proteinen der Signaltransduktion zur Entwicklung von Kardiomyopathien führt. So wiesen Mäuse mit einem dominant-negativen CREB-Gen (Transkriptionsfaktor) kardiale Veränderungen auf, die auch für die menschliche DCM charakteristisch sind [Fentzke, 1998]. Auch die ventrikelspezifische gp130-Inaktivierung führt zur Ausprägung einer DCM bei akuter

Druckbelastung [Hirota, 1999]. Die Überexpression des ras-Proteins (MAPK-Kaskade) resultiert in einer Hypertrophie mit gestörter Anordnung der Myofibrillen und beeinträchtigter diastolischer Funktion [Hunter, 1995]. Kürzlich konnten Mathur et al [Mathur, 1999] nachweisen, daß Mutationen in einem Enzym des kardialen Energiestoffwechsels zur Kardiomyopathie im Kindesalter führen. Desweiteren konnten Mutationen in einem Transkriptionsfaktor (EYA) sowie einer Proteinkinase in Familien mit DCM bzw. HCM nachgewiesen werden [Schonberger, 2000; Blair, 2001].

Diese Ergebnisse zeigen, daß nicht nur Proteine des Zytoskeletts an der Ätiologie von Kardiomyopathien beteiligt sind. Daher haben wir das CT-1 Gen auf die Möglichkeit hin untersucht, ebenfalls an der Entwicklung der DCM oder HCM beteiligt zu sein. Hierfür gibt es zwei mögliche Pathomechanismen. Im Falle einer monogenetischen Ursache wären Mutationen bei einzelnen Patienten zu erwarten, die bei einem Auftreten mehrerer Fälle in der entsprechenden Familie mit der Erkrankung kosegregieren würden. Darüberhinaus könnten Varianten im CT-1 Gen modifizierend auf die Penetranz der Erkrankung oder die Ausprägung des Phänotyps Einfluß nehmen. In diesem Fall wären Polymorphismen zu identifizieren, die aufgrund ihres häufigeren Auftretens in Patientenkollektiven mit Kardiomyopathien mit dem Phänotyp assoziiert sind. Häufige Polymorphismen, die in mehr als 5 % der Population auftreten, lassen sich mit 95 %iger Sicherheit detektieren, wenn das genetische Material von 92 gesunden Probanden analysiert wird. Daher wählten wir für diese Arbeit ein Kontrollkollektiv von 100 Personen. Der Vergleich der Häufigkeiten des hier identifizierten Polymorphismus im DCM- und HCM-Kollektiv bzw. bei den Kontrollen wies auf eine mögliche Assoziation mit der DCM hin. Zur Untersuchung dieses Trends erhöhten wir aus statistischen Gründen die untersuchte Patientenzahl.

Gen-Varianten können über eine veränderte Regulation hypertrophie-induzierender Gene eine Bedeutung bei erworbenen sekundären Kardiomyopathien sowie bei der Krankheitsprogression der familiären Formen haben [Chen, 1999]. Daher stellen diese Gene sowie deren regulatorische Sequenzen geeignete Kandidatengene für eine Mutationsanalyse dar. Hierzu zählt auch Cardiotrophin-1 aufgrund seiner Beteiligung an der Hypertrophie und der Apoptosehemmung von Myokardgewebe. So könnten Mutationen z.B. zur Synthese eines funktionslosen Proteins führen. Oder es entstehen Proteine, die aufgrund von Veränderungen bestimmter Erkennungssequenzen bzw. der Konformation, eine veränderte Rezeptorbindung aufweisen. Zusätzlich könnten Varianten auch die Stabilität und somit die Degradation der mRNA bzw des Proteins beeinflussen. Führen diese Veränderungen zu einer gesteigerten oder verminderten

Funktion, wären eine Hypertrophie respektive vermehrte Apoptose zu erwarten. Prinzipiell besteht aber auch die Möglichkeit, daß Funktionsausfälle durch andere IL-6-Zytokine, hauptsächlich LIF oder IL-6 kompensiert werden.

Varianten in der Promotorsequenz können ein verändertes Expressionsverhalten verursachen. Eine Zerstörung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen würde je nach Beteiligung von Suppressor- oder Enhancersequenzen zu einer Herauf- bzw. Herabregulation führen. Aber auch mutierte Sequenzen, die nicht unmittelbar an der Erkennung durch Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, könnten durch eine Beeinflussung der Sekundärstruktur ein verändertes Bindungsverhalten hervorrufen.

Für TNF, einem proinflammatorischem Zytokin, das an der Genese kardialer Erkrankungen, z.B. Myokarditis, beteiligt ist, konnten stabile interindividuelle Unterschiede in der Produktion des Proteins gezeigt werden, die vermutlich auf Vererbung beruhen [Molvig, 1988]. Westendorp [Westendorp, 1997] zeigte, daß bis zu 60 % dieser Variabilität genetisch determiniert sind. Als eine mögliche Ursache wird eine Einzelbasensubstitution im TNF-Promotor (TNF_{-308A}) angenommen. Dieser Polymorphismus konnte mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Malaria, Leishmaniose sowie anderen Infektionskrankheiten assoziiert werden [Knight, 1999]. Patel et al zeigten, daß ein TNF-Polymorphismus (306 G/A), der zu einer vermehrten TNF-Expression führt, bei Patienten mit HCM mit einem höheren linksventrikulären Masseindex und einer Erstmanifestation der Erkrankung in jüngerem Alter assoziiert ist [Patel, 2000].

Die Untersuchung der genetischen Variabilität verschiedener kardial exprimierter Gene und deren Beteiligung an komplex vererbten kardiovaskulären Erkrankungen leistet einen wesentlichen Beitrag bei der Aufklärung von Ätiologie und Pathogenese dieser Krankheiten. Zusätzlich könnten sich dadurch Möglichkeiten für kausale Therapiestrategien ergeben. Vorstellbar wären hier zum Beispiel der Einsatz synthetischer Oligonukleotide oder von Rezeptorenblockern zur Verminderung eines schädlichen Einflusses einer Proteinüberexpression. Ein absoluter beziehungsweise relativer Mangel ließe sich durch die Entwicklung synthetischer Proteine ausgleichen.

4.2.1 Die mögliche funktionelle Bedeutung des Aminosäureaustausches im Codon 92

Die Analyse der kodierenden Sequenzen einschließlich der Exon/Intron-Übergänge des CT-1-Gens bei 100 Kontrollpersonen sowie 64 DCM- und 53 HCM-Patienten ergab eine kodierende

Variante bei jeweils einem DCM- respektive HCM-Patienten. Beide Patienten waren heterozygot für diese Mutation.

Diese stellt einen Einzelbasenaustausch G→A an der Position +274 dar, der zu einer Substitution von Alanin durch Threonin führt. Dies erfolgt in einer Region, die zwischen den CT-1-Proteinen von Mensch, Maus und Ratte hoch konserviert ist (Abb.16).

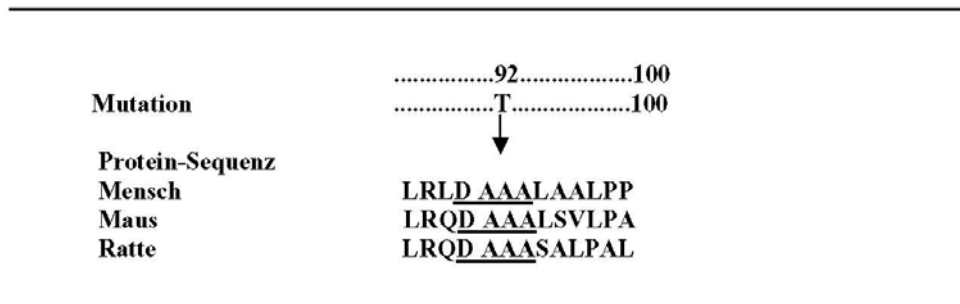


Abb. 16: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzhomologien im Bereich von Codon 87 bis 100 zwischen den CT-1-Proteinen von Mensch, Maus und Ratte. Der Pfeil markiert die Aminosäure 92, die durch eine Mutation (G→A) durch Threonin ersetzt wird.

Die Konservierung dieser Aminosäuren weist auf deren mögliche wichtige funktionelle Bedeutung hin. Darüber hinaus ist Alanin eine unpolare, hydrophile Aminosäure. Threonin stellt dagegen eine neutrale, polare und hydrophile Aminosäure dar.

Cardiotrophin-1 gehört aufgrund seiner Sequenz- und Strukturhomologien zur IL-6-Familie. Hierbei geht man von einem Molekül aus, das aus vier antiparallel angeordneten α -Helices mit dazwischen liegenden langen (AB, CD) und kurzen (BC) Aminosäureketten besteht. Robinson et al [Robinson, 1994] analysierten die möglichen Beziehungen zwischen der Struktur von LIF, einem weiteren Protein der IL-6-Familie, und dessen Bindung an die Rezeptoruntereinheiten LIFR sowie gp130. Als Vergleich dienten IL-6 und die Wachstumsfaktoren (GH), deren Struktur-Funktionsbeziehungen bereits analysiert wurden. Besonders letztere gelten als Prototypen für diese Struktur-Funktions-Beziehungen. Alle diese Faktoren besitzen zwei bzw. drei funktionelle Bereiche, die für die Bindung der Signaltransduktionseinheiten verantwortlich gemacht werden (*site I, II, III*). Es wird postuliert, daß IL-6 über die site I an den IL-6-Rezeptor und über die anderen beiden Regionen an jeweils ein gp130-Molekül bindet [Ciapponi, 1995]. LIF reagiert wahrscheinlich über die entsprechenden Bezirke der sites I und III mit einem einzigen LIF-Rezeptor und über site II mit gp130. Dabei gehören die AS 161-180 am C-terminalen Ende der D-Helix zur site I, Regionen um Ser36 in Helix A und um Ala117 in Helix C zur site II sowie das C-terminale Ende der CD-Verbindungsschleife zur site III [Robinson, 1994; Simpson, 1997].

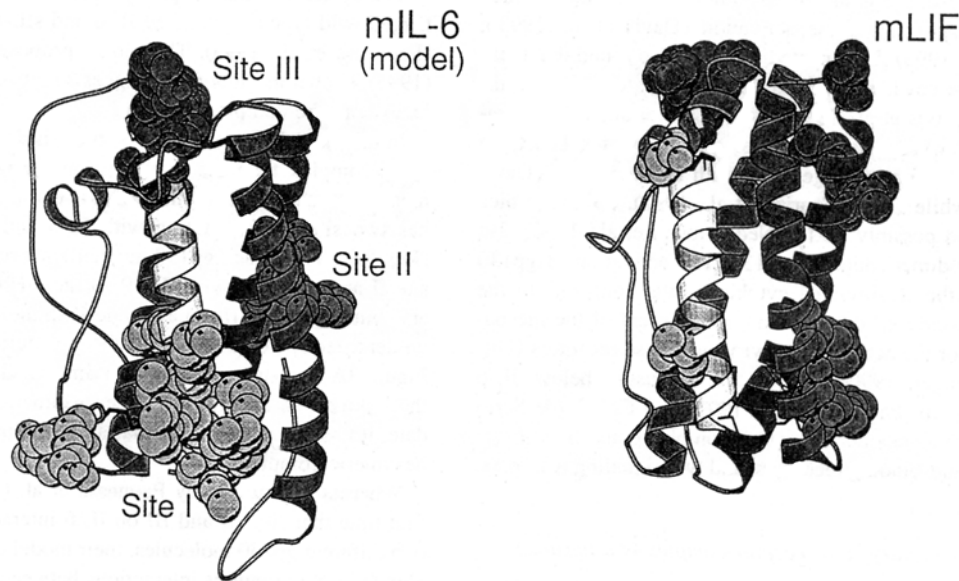


Abb. 17: Vergleich der IL-6- und LIF-Struktur der Proteine der Maus. Gezeigt sind die Regionen, deren Beteiligung an der Rezeptorbindung der Proteine der Maus sowie des Menschen angenommen wird. Diese werden als *Site I* (hellgrau), *Site II* (dunkelgrau) und *Site III* (schwarz) bezeichnet. (entnommen aus Simpson, 1997)

Neben diesen funktionell wichtigen Domänen gibt es noch eine Vielzahl weiterer bedeutender Aminosäuren, die an der Speziespezifität, der Konformation sowie der Rezeptorbindung beteiligt sind. So beeinflussen die AS 1-98 die Aktivität der Bindungsstelle I (*site I*). [Robinson, 1994]. Ein Vergleich zwischen der LIF- und CT-1-Sequenz zeigt, daß der oben erwähnte konservierte Bereich um Codon 92 am Anfang der B-Helix liegt. (Abb. 18).



Abb. 18: Ausschnitt, entsprechend der Helix B, aus Alignment der humanen CT-1 und LIF-Sequenzen aus (Pennica, 1996b). Konservierte AS zwischen den unterschiedlichen Proteinen CT-1, LIF und CNTF sind gesondert gekennzeichnet (Box). Das Alanin an Position 92 wird durch die hier beschriebene Mutation durch Threonin ersetzt und ist durch einen Kreis und einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Sekundärstrukturen von Proteinen lassen sich anhand der Eigenschaften der Aminosäuresequenz vorhersagen. Eine häufig angewandte Methode ist die von Garnier und Osguthorpe [Garnier, 1978]. Der Vergleich zwischen der Wildtyp und der mutierten Sequenz des Cardiotrophins zeigt, daß der hier identifizierte Aminosäureaustausch die korrekte Ausbildung der alpha-Helix stören könnte (siehe Abb. 19).

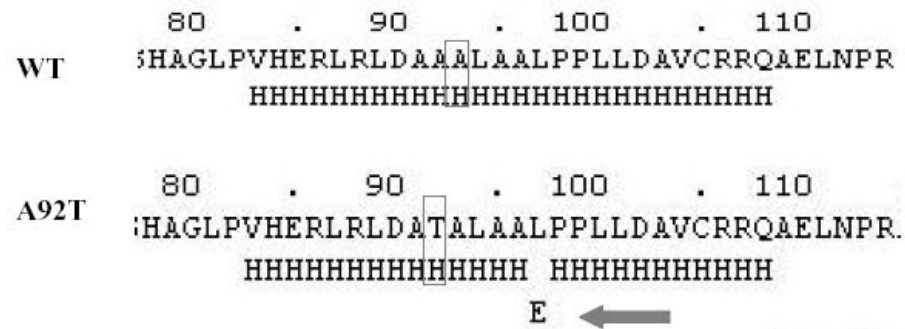


Abb. 19: Ausschnitt aus dem Modell der Sekundärstrukturen des Wildtyp (WT) und mutierten Cardiotrophins nach der Methode von Garnier und Osguthorpe. Zu erkennen ist gestörte Ausbildung der alpha-Helix durch die Mutation. H=Helix, E=Faltblattstruktur

Die mögliche Veränderung der Molekülstruktur und die Lage innerhalb eines konservierten Bereiches sowie in einer Region, die die Bindungsaktivität von LIF über bisher noch ungeklärte Mechanismen beeinflusst, weist auf eine mögliche Veränderung der Rezeptoraffinität des im Codon 92 mutierten CT-1 hin. Bindungsstudien in Kulturen kardialer Fibroblasten und Myozyten mit dem mutierten Protein könnten Aufschluß darüber geben, ob diese Variante die Rezeptorbindung tatsächlich verändert. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Frage nicht nachgegangen werden.

Die Frage, ob der identifizierte AS-Austausch an der Ausprägung des Phänotyps der Erkrankung in beiden Patienten beteiligt ist, konnte durch diese Arbeit nicht geklärt werden, da es in den Familien beider Patienten anamnestisch keine weiteren Betroffenen gab. Aufgrund der zeitlichen Limitation und des Umfangs der Arbeit wurden die Familienangehörigen nicht rekrutiert und eingehend untersucht. Eine weitergehende Phäno- und Genotypisierung beider Familien ist zur Klärung dieser Frage notwendig. Neben CT-1 könnten auch Mutationen in Sarkomerproteinen die Krankheitsursache bei beiden Patienten darstellen. Das Screening des Troponin-T, β -MHC sowie des Myosin-Bindungsprotein Gens, in denen bisher die häufigsten Varianten beschrieben wurden, konnte keine entsprechenden Varianten bei diesen Patienten nachweisen. Im Rahmen der Hypothese, daß CT-1 als ein modifizierendes Gen fungieren könnte, ist eine Beteiligung an der Krankheitsentwicklung nicht vollständig ausgeschlossen. Falls die Veränderung des Proteins zu einer gesteigerten Rezeptorbindung führt, könnte dies zur Hypertrophie bei beiden Patienten beitragen. Der gegenteilige Effekt könnte über eine verringerte Apoptosehemmung die Progression einer Herzinsuffizienz beeinflussen. Die klinischen Daten beider Patienten lassen zum jetzigen Zeitpunkt allerdings keine Rückschlüsse zu (siehe Tabelle 26).

4.2.2 Polymorphismus im Promotor an der Position -130

Die SSCP-Analyse der in dieser Arbeit ermittelten Promotorregion des Cardiotrophin-1-Gens ergab einen Einzelbasenaustausch von G → T an der Position -130. Diese Variante fand sich häufiger im DCM-Kollektiv mit 10 von 201 Patienten, wohingegen nur 1 von 53 HCM-Patienten und 3 Kontrollpersonen (n=217) die Substitution aufwiesen. Daraus ergeben sich folgende Allelfrequenzen: DCM 2,5 %, HCM 0,9 % und Kontrollen 0,7 %. In allen Fällen lag die heterozygote Form vor. Die statistische Auswertung ergab, daß der Unterschied zwischen den Häufigkeiten nicht auf dem Niveau von $p=0,05$ signifikant ist. Es zeigt sich aber ein Trend zu einem häufigeren Auftreten bei Patienten mit DCM. Aufgrund der insgesamt niedrigen Allelfrequenz wäre hier die Untersuchung eines größeren Patientenkollektivs notwendig.

Bei der hier identifizierten Variante handelt es sich um einen Polymorphismus. Polymorphismen finden sich häufiger in nicht-kodierenden Sequenzen, wie z.B. in Promotoren und Intronbereichen. Sie werden oft für Kopplungsstudien eingesetzt. Darüberhinaus können sie aber auch krankheitsätiologisch relevant werden. Durch eine Veränderung von Splice-Acceptor- oder Donor-sites innerhalb von Intronsequenzen können verschiedene mRNA-Splicevarianten entstehen. Varianten im Promotorbereich können je nach Lage spezifische Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zerstören oder räumlich beeinflussen.

Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Polymorphismus an Position -130 zerstört keine der bekannten Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren. Sie liegt aber in einem Abschnitt, der im Luciferase-Reportergen-Assay die höchste Aktivität aufwies. Mit dem Computerprogramm TRANSFAC konnten im Gegensatz dazu nur zwei AP1-Bindungsstellen in dieser Region identifiziert werden. Insgesamt liegt also die Vermutung nahe, daß innerhalb der ersten 200 bp eine Enhancerregion liegen könnte, deren Konsensussequenzen bisher noch unbekannt sind.

Um einen möglichen Einfluß der Variante auf die Transkription des CT-1-Gens zu überprüfen, wurde in der Arbeitsgruppe ein Gelshift (electrophoretic mobility shift assay) durchgeführt. Mit diesem Test wird die Verdrängung radioaktiv markierter Oligonukleotidsonden im mutierten Bereich durch Transkriptionsfaktoren der jeweils verwendeten Zellen analysiert. Für die in dieser Arbeit interessierende Promotorvariante konnte kein verändertes Bindungsverhalten nachgewiesen werden. Dadurch wird ein Einfluß aber nicht endgültig ausgeschlossen, da einige Enhancer und Promotoren nur gewebespezifisch aktiviert werden [Lewin, 2000]. Im Falle des CT-1-Gens müßte also das Bindungsverhalten in menschlichen Kardiomyozyten respektive

kardialen Fibroblasten getestet werden. Es wurden hier aber Huvec-Zellen (humane Gefäßendothelzellen aus Nabelschnurgefäßen) eingesetzt. Eine weitere Methode zur Überprüfung des Einflusses des Basenaustausches auf die Transkription wäre der Einsatz des mutierten Allels in ein Luciferase-Reportergen-System. Aber auch dieses Verfahren ist vom jeweiligen Zellkontext abhängig. Da hier hauptsächlich die Bedeutung für die Entwicklung von Kardiomyopathien von Interesse ist, wäre nur die Transfektion in menschliche Kardiomyozyten sinnvoll, um auch das Problem der Gewebespezifität zu berücksichtigen. Menschliche Myokardzellen, insbesondere bereits ausdifferenzierte Zellen, sind aber nur schwer zu gewinnen und in Kultur zu halten. Abgesehen von einer geringen Transfektionseffizienz in solchen Kulturen finden Veränderungen in kultivierten Zellen statt, durch die die Expression spezifischer Gene, unter anderem auch von Transkriptionsfaktoren, verändert wird [Hefti, 1997].

Die Zugänglichkeit trans-aktiver Faktoren zu den entsprechenden Elementen in regulatorischen Genbereichen ist wesentlich von der Verpackung der DNA in Chromatinstrukturen abhängig. Diese wird über Nukleosomen reguliert. Die Aktivierung eines Gens ist somit von der korrekten Formation der Nukleosomen in der Promotorregion abhängig. Die Bindung der Nukleosomen benötigt lange DNA-Abschnitte von ca. 200 bp Länge. Dabei bestimmt die DNA-Sequenz die exakte Position [Wallrath; 1994]. Der hier identifizierte Austausch einer Purinbase (Guanin) durch ein Pyrimidin (Thymin) innerhalb einer Serie von 11 Purinen (A₄G₇) kann möglicherweise die korrekte Nukleosomenposition negativ beeinflussen.

Die Apoptose von Kardiomyozyten stellt einen kritischen Faktor beim Übergang der kompensierten Herzinsuffizienz in die dekompenzierte Form dar [Narula, 1996; Olivetti, 1997]. Sie ist auch an der Entwicklung der DCM beteiligt. CT-1 wiederum wirkt antiapoptotisch in Myozytenkulturen [Sheng, 1997]. Die kammerspezifische Inaktivierung von gp130, der Signaltransduktionseinheit des CT-1-Rezeptors führte zur Entwicklung eines DCM-ähnlichen Phänotyps bei akuter Druckbelastung aufgrund einer gesteigerten Apoptose der Kardiomyozyten [Hirota, 1999]. Eine verminderte Expression von CT-1, ausgelöst durch eine genetische Variante im Enhancerbereich könnte also in einem verringerten antiapoptotischen Effekt des Zytokins resultieren.

Aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung in den drei untersuchten Personengruppen und dem häufigeren Auftreten der Variante bei DCM-Patienten, ist eine pathogenetische Bedeutung im Rahmen des genetischen Hintergrundes vorstellbar. So fällt bei der Betrachtung der klinischen Daten der Patienten auf, daß alle DCM-Patienten vermutlich eine sekundäre Form der Erkrankung aufweisen. Darüberhinaus konnte bei dem HCM-Patienten zusätzlich eine

Frameshift-Mutation im Myosin-Bindungsprotein C (MyBPC) identifiziert werden, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Bisher ist die Rolle des MyBPC noch ungeklärt. Es ist vermutlich an der Entstehung der dicken Filamente und der Stabilität des Myofilaments beteiligt. Mutationen in diesem Gen gelten allgemein als eher gutartig. Bei unserem Patienten wurde die Erkrankung im Alter von 56 Jahren diagnostiziert. Herzrhythmusstörungen machten die Implantation eines ICD (Implantierbarer Cardioverter Defibrillator) 13 Jahre nach Diagnosestellung notwendig. Unter der Hypothese, daß Cardiotrophin als sogenanntes „modifier-gene“ die Entwicklung oder Ausprägung der Kardiomyopathien beeinflusst, ist es vorstellbar, daß der hier nachgewiesene Promotorpolymorphismus zu einer gestörten CT-1-Expression und damit zu gestörten myokardialen Adaptionsprozessen führt.

Letztendlich bedarf es weitergehender Studien, um eine mögliche funktionelle Bedeutung der hier identifizierten Variante im CT-1-Promotor zu untersuchen. Für die Feststellung einer eventuellen Assoziation mit der Dilatativen Kardiomyopathie ist es notwendig, die Häufigkeit dieser Variante in einem größeren Patienten- und Kontrollkollektiv zu untersuchen. Die hierfür benötigten Fallzahlen liegen je nach Allelfrequenz zwischen 200-2000 Personen [**Risch, 1996**].

4.2.3 Deletion an den Positionen -992 bis -995 der Promotorregion

Bei einer Patientin, die an der hypertrophen Form der Kardiomyopathie erkrankt war, fand sich eine Deletion der vier Basen CTTT zwischen den Positionen -992 und -995. Die Patientin ist heterozygot für diese Mutation, die bei keiner weiteren Person nachgewiesen wurde.

Durch diese Variante wird keine Konsensussequenz für Transkriptionsfaktoren unmittelbar zerstört. Sie liegt aber nur 9 bp stromaufwärts einer STAT-Bindungsstelle (Position -984). Transkriptionsfaktoren binden an Sequenzen, die über die eigentlichen Konsensussequenzen hinausgehen. Die meisten Faktoren binden an ca. 20 bp, wohingegen die entsprechende Konsensussequenz nur bis zu 10 bp einnimmt [**Lewin, 2000**]. Zusätzlich rückt die CAAT-Box an Position -1045 als Folge der Deletion räumlich näher an die STAT-Bindungsstelle heran. Dies kann zu einer Beeinflussung der Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren führen. Insgesamt besteht also die Möglichkeit, daß die CT-1-Transkription durch diese Deletion beeinträchtigt wird. Zur Klärung dieser Frage wären, analog zum oben beschriebenen Polymorphismus, ebenfalls weitergehende Studien, idealerweise in menschlichen Myokardzellen, notwendig.

Interessanterweise besitzt die betroffene Patientin zusätzlich eine stumme Mutation im Gen des kardialen Myosinbindungsprotein C. Da von dieser Patientin keine klinischen oder anamnestischen Daten zu erhalten waren, lassen sich keine näheren Aussagen treffen. Vorstellbar ist aber auch hier eine Kombination aus genetischen Varianten in verschiedenen Genen, die letztendlich zur Ausbildung der Kardiomyopathie geführt hat oder deren Ausprägung und Verlauf beeinflußt.

4.3 Veränderung des CT-1 mRNA Gehaltes im menschlichen Myokard bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz

4.3.1 Nutzung von PDH als Referenzgen

Unter Verwendung einer extern standardisierten RT-PCR-Technik wurde der CT-1 mRNA-Gehalt in menschlichen, rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien semiquantitativ bestimmt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg um 82 % bei Patienten mit Herzinsuffizienz.

Aufgrund der variierenden Effizienz des PCR-Verfahrens und des exponentiellen Anstiegs der Kopienzahl führen schon geringfügige Abweichungen zu Schwankungen der Menge des PCR-Produkts, die die exakte Quantifizierung erschweren. Schon geringe Temperaturdifferenzen, Pipettierabweichungen oder verschiedene Mengen an DNA-Polymerase-Inhibitoren im Probengut resultieren in Abweichungen des Produktes zwischen den einzelnen Proben (sample-to-sample) und einzelnen Reaktionsgefäßen (tube-to-tube). Um diese Fehlerquellen zu berücksichtigen und auszugleichen, wurden verschiedene Standardisierungsverfahren eingeführt. Man unterscheidet interne, kompetitive oder nichtkompetitive, sowie externe Standards. Eine einfache und für die semiquantitative Analyse relativ sichere Methode stellt die Wahl einer unverändert exprimierten mRNA dar, die zur Ziel-RNA in Relation gesetzt wird (externe Standardisierung).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung in Relation zur mRNA der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH). Diese stellt einen mitochondrialen Multienzymkomplex dar, der die irreversible Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA in Säugern katalysiert. Dadurch werden die Kohlenstoffatome der Kohlenhydrate und Aminosäuren der Oxidation im Zitratzyklus oder der Lipidsynthese zugeführt [Reed, 1974]. Die mRNA dieses Enzyms ist pseudogen-frei und zeigte bereits ein unverändertes Expressionsverhalten in insuffizienten Herzen [Ungerer, 1993]. Dadurch stellt sie einen geeigneten Standard dar.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung bestätigen die unveränderte Expression der PDH-mRNA. So lag die Höhe der HPLC-Kurve in allen drei Gruppen zusammen bei 6790 ± 802 (BS: 6889 ± 644 ; TX: 6799 ± 993 ; BK: 6576 ± 679). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression in den drei Gruppen.

4.3.2 Mögliche Bedeutung der CT-1-Induktion im insuffizienten Myokard

Im Verlauf der letzten Jahre konnten mehrere Studien die Beteiligung von CT-1 an der Entstehung einer Herzinsuffizienz aufzeigen. So fanden Talwar et al. [Talwar, 1999] einen erhöhten Plasmaproteinspiegel in einer kleinen Patientengruppe sowie eine Korrelation zu einigen funktionellen Parametern. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Induktion der CT-1-Expression im Myokard könnte an dieser gesteigerten Proteinsynthese beteiligt sein. Nach Abschluß der hier beschriebenen experimentellen Arbeit wurde diese Annahme durch Zolk et al. bestätigt. Neben einem gesteigerten CT-1 mRNA und Proteingehalt im Myokard terminal herzinsuffizienter Patienten zeigte diese Arbeitsgruppe auch eine vermehrte gp130 mRNA Expression bei gleichzeitig reduziertem gp130-Proteingehalt. Das Verhältnis von aktiviertem STAT3 zum totalen STAT3-Gehalt blieb dabei unverändert. Im Endstadium der Erkrankung scheint also einer exzessiven Aktivierung des Signaltransduktionsweges durch eine Rezeptordegradation entgegengesteuert zu werden [Zolk, 2002]. Auch der Angiotensin-Rezeptor Typ I sowie die β -Katecholaminrezeptoren werden im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz vermindert exprimiert [Ungerer, 1993]. Dadurch verringert sich die Sensitivität der Myokardzellen gegenüber positiv inotropen Substanzen. Ebenso könnte die Herabregulation der gp130-Rezeptoruntereinheit zu Funktionsverlusten führen.

Unklar ist bisher allerdings die Rolle, die CT-1 in der Pathogenese der Herzinsuffizienz einnimmt. In der hier untersuchten Patientengruppe konnte eine hochsignifikante Korrelation der CT-1 mRNA zur verminderten links- sowie rechtsventrikulären Ejektionsfraktion ($p=0,002$ bzw. $p=0,003$) festgestellt werden. Es bleibt aber ungeklärt, ob eine CT-1-Induktion die Ursache oder die Folge der Funktionsverschlechterung darstellt. Auch die Korrelation zur Zunahme der LV-Volumenindizes als Ausdruck einer zunehmenden Ventrikeldilatation weist auf einen möglichen Zusammenhang mit einer Einschränkung der linksventrikulären Funktion hin. Auch für IL-6, das über die gleiche Rezeptoruntereinheit gp130 wirkt, konnte eine positive Korrelation zur Schwere der Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [Munger, 1996]. Auch bei dieser Studie blieb der ursächliche Zusammenhang unklar. Diskutiert werden rezidivierende hypoxische Episoden, die in insuffizienten Herzen nachgewiesen werden konnten und zu einer Rechtsverschiebung der Hämoglobindissoziationskurve führen. Dies resultiert in einem Sauerstoffmangelsystem. IL-6 und CT-1 wiederum werden durch hypoxischen Stress induziert. Eine weitere Möglichkeit ist die Erhöhung im Rahmen einer Akut-Phase-Reaktion bzw. eines chronischen Entzündungsprozesses. Da für beide Zytokine bisher ein unmittelbarer zytotoxischer Effekt nicht

gezeigt werden konnte, scheint die Hypothese unwahrscheinlich, daß eine gesteigerte Produktion von CT-1 über eine Myokardschädigung zu einer Funktionsverschlechterung führt. Wahrscheinlicher ist es, daß die Induktion der Transkription eine kompensatorische Folge der stattfindenden Myokardveränderungen darstellt. Aufgrund der Ergebnisse von Zolk et al. ist ein Versagen dieser Kompensationsmechanismen im Verlauf der Herzinsuffizienz anzunehmen. Möglich ist trotzdem auch ein schädigender Einfluß von CT-1 auf das Myokard, dem durch eine Rezeptorreduktion entgegensteuert wird. Interessant wäre daher die Beobachtung der Expression der verschiedenen Faktoren des CT-1 Signaltransduktionsweges im zeitlichen Verlauf ausgehend von frühen Stadien.

In Anbetracht der bekannten Funktionen des Cardiotrophin-1 ist die Beteiligung an myokardialen Adaptationsprozessen auf mehreren Wegen vorstellbar. Am wahrscheinlichsten ist eine Beeinflussung der Herzinsuffizienzentwicklung durch CT-1 über eine Kombination dieser Mechanismen.

A) Die Schädigungen, die zu einer Herzinsuffizienz führen, gehen mit einem Verlust kontraktiler Funktionen einher. Das Myokard reagiert darauf unter anderem mit einer kompensatorischen Hypertrophie der intakten Myozyten. Für CT-1 konnte die Induktion der Kardiomyozytenhypertrophie in vitro und in vivo nachgewiesen werden [Pennica, 1995b; Jin, 1996]. Zusätzlich wurde eine gegenseitige Beeinflussung zwischen CT-1 und Angiotensin II im Rahmen der kardialen Hypertrophie festgestellt [Fukuzawa, 2000; Sano, 2000]. CT-1 führt zu einem typischen Bild der Hypertrophie, das durch eine Addition neuer Sarkomere in Serie gekennzeichnet ist [Wollert, 1996]. Dies würde zu einer Umverteilung der erhöhten Wandbelastung auf eine größere Zahl von Myofibrillen führen. Dieser, anfangs sinnvolle, Kompensationsmechanismus bewirkt im längerfristigen Verlauf aber einen gegenteiligen Effekt. Durch eine Verlängerung der Myozyten wird deren Sarkomerfunktion behindert. Außerdem fördert dies die Gefügedilatation. Schließlich bewirkt die Hypertrophie auch eine Zunahme der Diffusionsstrecke und damit eine Beeinträchtigung des Nährstofftransports [Fuchs, 2000]. Tatsächlich bestand in der hier untersuchten Patientengruppe eine Korrelation zwischen der erhöhten CT-1-mRNA-Menge und dem linksventrikulären Masseindex (LVMI) aber nicht mit der enddiastolischen Muskeldicke (LVEDMD). Im Verlauf der DCM kommt es neben einer Dilatation auch zu einer Hypertrophie. Aufgrund der Dilatation und der damit einhergehenden zunehmenden Wandspannung macht sich die Hypertrophie nicht in einer Zunahme der Wanddicke bemerkbar. Aussagen zur Zunahme der Muskelmasse lassen sich daher besser unter Zuhilfenahme des Masseindex treffen. In dessen Berechnung gehen neben der Septum- und Hinterwanddicke auch der enddiastolische Durchmesser und die Körperoberfläche ein.

B) Entgegen früherer Vorstellungen scheint auch ein unterschiedliches Ausmaß der Apoptose (programmierter Zelltod) bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine Rolle zu spielen. Die Apoptose folgt einem genetisch determiniertem Programm energieabhängiger molekularer und biochemischer Ereignisse. Da diese Prozesse meistens nur in Zellen beobachtet wurden, die am normalen Zellzyklus teilnehmen, ging man davon aus, daß sie nicht in terminal differenzierten Zellen, wie Neuronen und Myokardzellen stattfinden. Inzwischen konnte aber durch zahlreiche in vitro-Studien und Tiermodelle gezeigt werden, daß eine Vielzahl an Stimuli, wie z.B. postischämische Reperfusion, Myokardinfarkt, schnelle ventrikuläre Schrittmacherstimulation, mechanische Dehnung, Druckbelastung oder Hypertension die Apoptose von Kardiomyozyten induzieren [Colucci, 1996]. Unklarheit herrscht allerdings bezüglich des Ausmaßes und der Beteiligung am Krankheitsprozess. Dies liegt zum Teil an methodischen Problemen sowie an der zeitlichen Limitation des Nachweises apoptotischer Zellen (24 Stunden). So berichteten Narula et al. [Narula, 1996] von 5 bis 35,5 % apoptotischer Zellen. Dieses Ergebnis wurde von verschiedenen Autoren angezweifelt, die deutlich niedrigere Zahlen erhielten. Olivetti et al. [Olivetti, 1997] fanden zwar einen 232-fachen Anstieg der Myozytenapoptose, trotzdem lag der Anteil insgesamt unter 1%. Auch Saraste et al. [Saraste, 1997] wiesen mit einer ähnlichen Methode nur einen Anteil apoptotischer Zellen von 0,08 % bei Patienten mit Herzinsuffizienz (Kontrollen 0,01%) nach. Letztere Ergebnisse sind wahrscheinlicher, da das von Narula et al. beschriebene hohe Vorkommen der Apoptose innerhalb weniger Tage zum Tod der Patienten führen würde. Trotz dieser divergierenden Ergebnisse ist man davon überzeugt, daß die Apoptose eine wichtige Rolle in der Pathogenese und vor allem beim Übergang einer kompensierten in eine dekompenzierte Form der Herzinsuffizienz spielt. Für die Induktion der Apoptose werden verschiedene Faktoren verantwortlich gemacht. Zum einen könnten dies mechanische Faktoren, wie z.B. Volumenüberlastung und erhöhte enddiastolische Drücke, sein. Zum anderen kommen Neurohormone in Betracht. Kajstura et al. [Kajstura, 1997] zeigten eine Apoptosesteigerung durch Angiotensin II über den AT₁-Rezeptor. Auch ANF, das bei kardialer Hypertrophie verstärkt exprimiert wird, erhöhte den Apoptoseindex in Kardiomyozytenkulturen [Wu, 1997]. Ungeklärt ist bisher die Frage, ob die Apoptose eine frühe Ursache oder ein spätes Ereignis im Endstadium der Herzinsuffizienz darstellt. Wie bereits im Kapitel 1 dargestellt, kann CT-1 antiapoptotisch wirken. Dieser Effekt scheint über verschiedene Signalwege vermittelt zu werden. Zum einen können Hitzeschockproteine [Stephanou, 1998] beteiligt sein. Zum anderen wurde die Induktion von NF-κB und Bcl-xl, zwei Transmittern der Antiapoptose, nachgewiesen [Middleton, 2000; Kuwahara, 2000]. Die gesteigerte CT-1 Expression im Myokard

herzinsuffizienter Patienten könnte demzufolge eine Gegenregulation gegen eine gesteigerte Apoptose darstellen.

C) Verschiedene Studien zeigten außerdem eine Beteiligung proinflammatorischer Zytokine an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Dazu gehört auch der Tumor- nekrose- faktor (TNF) α . Dieser bewirkt neben einer negativen Inotropie auch eine direkte Zytotoxizität. Benigni et al. [Benigni, 1996] konnten zeigen, daß CT-1 die TNF-Produktion im Herzen und im Serum von Mäusen nach der Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) hemmt. Dies unterstreicht die bereits oben erwähnte mögliche Beteiligung von CT-1 an Kompensationsmechanismen, die der Zerstörung von Myokardgewebe und der Beeinträchtigung der Herzfunktion im Rahmen verschiedener pathologischer Einflüsse auf das kardiovaskuläre System entgegenwirken. Vorstellbar ist in diesem Zusammenhang eine Störung des Gleichgewichts zwischen Schädigung und Reparaturmechanismen, wodurch es zur Verschlechterung der Myokardfunktion kommt.

D) Im Rahmen einer Herzinsuffizienz entwickelt sich häufig eine endotheliale Dysfunktion, die zu einer gestörten Gewebepfusion führt. Eine beeinträchtigte Mikrozirkulation z.B. des Myokards führt wiederum zur Ischämie, einer weiteren Gewebeerstörung und zur kardialen Dysfunktion [Kiowski, 1998]. Die Durchblutungsstörungen scheinen durch proinflammatorische Zytokine ausgelöst zu werden. So konnten Vanderheyden et al. [Vanderheyden, 1998] einen Zusammenhang zwischen erhöhten Zytokinleveln (TNF) und einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation im Gefäßkreislauf des Unterarms von Herzinsuffizienzpatienten aufdecken. Dies wird wahrscheinlich teilweise durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems andererseits aber auch durch eine gesteigerte Produktion freier Sauerstoffradikale sowie eine gestörte NO-Produktion bewirkt. Schon 1982 berichteten Zelis et al [Zelis, 1982] über einen gesteigerten Vasomotorentonus und eine verminderte Vasodilatation bei körperlicher Anstrengung bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Für Cardiotrophin-1 konnte in vivo nachgewiesen werden, daß die intravenöse Gabe zu einer Verminderung des arteriellen Mitteldrucks und damit zur Abnahme des totalen peripheren Widerstands führt [Jin, 1998]. Diese Effekte werden teilweise über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) vermittelt [Hamanaka, 2000]. Denkbar ist also, daß CT-1 neben einem direkten Einfluß auf das Myokard auch über eine Senkung der Vorlast und damit Entlastung des Myokards kompensatorisch auf die pathologischen Prozesse bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz wirkt. Dieser Mechanismus muß allerdings kritisch betrachtet werden, da in den meisten physiologischen Zusammenhängen Zytokine lokal auto-, para- bzw. juxtakrin wirken. Die biologische Wirkung ist also nicht nur von den Zielzellen, sondern auch vom intrazellulären Milieu und dem biologischen Kontext der Zytokinaktivierung abhängig. Demzufolge sind die Ergebnisse einer

systemischen bzw. in vitro Gabe rekombinanter Zytokine vorsichtig zu interpretieren [**Nathan, 1991; Kelly, 1997**].

4.3.3 Limitationen der Untersuchung

Obwohl die Ergebnisse der mRNA-Quantifizierung mit anderen Studien weitgehend übereinstimmen, müssen einige Faktoren berücksichtigt werden, die die Aussagekraft der gefundenen Resultate negativ beeinflussen.

Die hier untersuchte Patientengruppe ist nicht groß genug, um sichere Aussagen treffen zu können. Der limitierende Faktor für eine weitergehende mRNA-Quantifizierung war hierbei die eingeschränkte Verfügbarkeit des Materials (Biopsien), da dieses nur durch invasive Verfahren gewonnen werden kann. Notwendig wäre auch eine Quantifizierung der CT-1 Proteinmenge sowie der mRNA und Proteinlevel weiterer Faktoren des Rezeptorsystems. Weiterhin müsste neben einem externen auch ein interner Standard eingesetzt werden, um mögliche Fehlerquellen auszugleichen.

Talwar et al. [**Talwar, 2000**] führten Korrelationsanalysen zwischen der Höhe der Proteinmenge im Plasma und einigen echokardiographischen Daten in einer Gruppe von 15 Patienten und 15 Kontrollen durch. Auch hierbei ergab sich ein statistischer Zusammenhang mit funktionellen Parametern. Bestätigt wurden diese Ergebnisse kürzlich durch die umfangreicheren Analysen von Zolk et al (8 Kontrollen, 23 Patienten) [**Zolk, 2002**].

5 Zusammenfassung

Cardiotrophin-1 ist ein Zytokin, das aufgrund seiner Hypertrophie-induzierenden Eigenschaften vor wenigen Jahren identifiziert wurde [Pennica, 1995a]. Es wird der Familie der Interleukin-6-Zytokine zugeordnet, zu denen auch IL-11, CNTF, OSM und LIF gehören. Diese Substanzen wirken über die gemeinsame Rezeptoruntereinheit gp130.

Neben den Einflüssen von CT-1 auf hämatopoetische, hepatische und neuronale Zellen ist das Zytokin auch an kardiovaskulären Prozessen beteiligt. Einerseits konnte die Induktion der Kardiomyozytenhypertrophie in vitro und in vivo nachgewiesen werden. Dabei unterscheidet sich das histologische Muster von dem durch G-Protein-gekoppelte Signale induziertem durch eine Anordnung neuer Sarkomereinheiten in Serie statt parallel. Auch das Expressionsmuster spezifischer Hypertrophiemarker ist unterschiedlich. Daneben hat CT-1 die Fähigkeit, die Apoptose von Kardiomyozyten in vitro aufzuhalten. Verschiedene transgene Tiermodelle zeigten, daß gp130 eine wichtige Rolle in der embryonalen und postnatalen Regulation kardialer Prozesse einnimmt. Ein wichtiger Ligand scheint dabei CT-1 zu sein, da erhöhte mRNA- und Protein-Spiegel bei genetisch hypertensiven Ratten bzw. im Plasma herzinsuffizienter Patienten nachgewiesen werden konnten.

Basierend auf diesen Ergebnissen war das Ziel dieser Arbeit die Analyse der möglichen Beteiligung genetischer Varianten der kodierenden sowie der regulatorischen Region an der Pathogenese der Hypertrophie bzw. Dilatativen Kardiomyopathie im Rahmen eines genetischen modifizierenden Hintergrunds. Da die Sequenzen der 5'-flankierenden Region noch unbekannt waren, sollten sie identifiziert und bezüglich regulatorischer Eigenschaften analysiert werden.

Da mehrere Studien darauf hinweisen, daß eine gesteigerte Expression von Zytokinen der Interleukinfamilien an der Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz beteiligt ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit auch das Expressionsverhalten der Cardiotrophin-1 mRNA im Myokard herzinsuffizienter Patienten untersucht werden.

Es konnten 1,1 kb der 5'-flankierenden Region sequenziert werden. Die anschließende Luciferase-Reportergen-Analyse wies regulatorische Aktivitäten für den gesamten Bereich nach. Das Computerprogramm TRANSFAC identifizierte Konsensussequenzen verschiedener Transkriptionsfaktorbindungsstellen, konnte aber keine TATA-Box nachweisen. Es handelt sich demzufolge um einen TATA-losten Promotor. Insgesamt enthält die Region 2 CAAT-Boxen (-1043, -976), eine STAT-Bindungsstelle (-984), eine SP-1-Sequenz (-582), ein cAMP-

responsives Element (-639), ein GATA-Motiv (-484), eine AP-1-Sequenz (-619) und neun AP-2-Erkennungssequenzen (-716, -438, -266, -248, -207, -181, -73, -72).

Für die Mutationssuche wurden 64 Patienten mit DCM, 53 Patienten mit HCM sowie 100 Kontrollpersonen mittels PCR-SSCP-Analyse untersucht. Für das Promotorfragment "ct1gap6" wurden die DCM-Gruppe auf 201 und die Kontrollgruppe auf 217 Personen erhöht.

Die kodierende Region wurde einschließlich der Exon/Intron-Übergänge analysiert. Es konnte eine kodierende Variante im Codon 92 mit einem Alanin zu Threonin-Austausch bei jeweils einem DCM- bzw. HCM-Patienten identifiziert werden. Diese Substitution liegt in einem Bereich, der zwischen verschiedenen Spezies (Ratte, Maus, Mensch) konserviert ist. Durch die Mutation könnte die Sekundärstruktur gestört werden. Strukturvergleiche mit dem verwandten LIF-Protein zeigten eine Lokalisation in einem Bereich, der Einfluß auf die LIF-Rezeptor-Bindung ausübt.

Die Promotorregion erwies sich als relativ invariabel. Es wurden lediglich eine Basenpaarsubstitution bei -130 (G/T) und eine Deletion der Basen CTTT zwischen -992 und -995 gefunden. Der Polymorphismus an Position -130 fand sich bei 10 von 201 DCM-, 1 von 53 HCM-Patienten und 3 von 217 Kontrollpersonen. Es zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz zu einem häufigeren Auftreten bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie. Die CTTT-Deletion konnte nur bei einer Patientin mit HCM nachgewiesen werden. Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um einen Einfluß der identifizierten Varianten auf die Zytokinaktivität bzw. -expression und eine mögliche pathogenetische Relevanz für die Entstehung der DCM bzw. HCM festzustellen.

Für die Quantifizierung der CT-1 mRNA wurde die Gesamt-RNA aus rechtsventrikulären Endomyokardbiopsien von 6 Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (=CHI, LVEF_m= 35%), von 5 Patienten nach Herztransplantation (=TX, LVEF_m=62%) sowie von 3 Kontrollpatienten (=KO, LVEF_m= 73%) isoliert. Die Messungen erfolgten semiquantitativ mittels HPLC-Analyse und extern standardisiert (PDH-mRNA). Es konnte ein relativer Anstieg der CT-1 Expression um 82% ($p < 0,002$) bei den Patienten mit eingeschränkter LVEF festgestellt werden. Zwischen den beiden Kontrollgruppen KO und TX fand sich kein signifikanter Unterschied. Interessanterweise besteht eine enge Korrelation zu hämodynamischen Parametern, am deutlichsten zur LVEF ($p < 0,001$) und zur RVEF ($p < 0,002$).

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz kommt es also zu einer vermehrten Expression von CT-1, die zur Schwere der eingeschränkten Herzfunktion korreliert. Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen auf das Myokard kann CT-1 den Krankheitsprozess auf verschiedenen Wegen beeinflussen. Einerseits kann CT-1 eine Rolle bei der kompensatorischen Hypertrophie spielen.

Andererseits konnte die Beteiligung der Apoptose an der Progredienz der Herzinsuffizienz gezeigt werden, die durch CT-1 antagonisiert werden könnte. Darüberhinaus hemmt CT-1 die TNF-alpha-Produktion, einem proinflammatorischen Protein, das ebenfalls an der Pathogenese beteiligt ist. Schließlich konnte für CT-1 in vivo eine Senkung des mittleren Arteriendruckes gezeigt werden, wodurch es eine Vorlastsenkung bewirken könnte.

Da die hier untersuchte Patientengruppe zu klein ist, um endgültige Aussagen zu treffen, sind weitere Untersuchungen in größeren Kollektiven und mit spezifischeren Methoden (interner Standard, Proteinmessung) notwendig. Kürzlich wiesen Zolk et al. neben einer gesteigerten CT-1 Expression eine gp130-Rezeptordegradation bei terminaler Herzinsuffizienz nach. Unklar ist hierbei, ob es sich dabei um einen Schutzmechanismus gegen einen übermäßigen Einfluß von CT-1 auf das Myokard oder um ein Versagen von Kompensationsmechanismen handelt.

6 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACRS-Assay	Amplification Created Restriction Site-Assay
AgNO ₃	Silbernitrat
Amp	Ampicillin
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
Ang II	Angiotensin II
APS	Ammonium Persulfat
AS	Aminosäure
AT ₁	Angiotensin II Typ-1 Rezeptor
Aqua dest.	Aqua destillata, destiliertes Wasser
Aqua inject.	Aqua injectabilia
β-MHC	beta-Myosin-Schwerkette (myosin heavy chain)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderalbumin (Bovines Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	copy-DNA
C/EBP	CAAT-/Enhancer binding protein
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CRE	cAMP-responsives Element
CT-1	Cardiotrophin-1
dATP	Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-Triphosphat
DCM	Dilatative Cardiomyopathy

ddATP	2',3'-Didesoxyadenosin-5'-Triphosphat
ddCTP	2',3'-Didesoxycytidin-5'-Triphosphat
ddGTP	2',3'-Didesoxyguanosin-5'-Triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Didesoxythymidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxy-ribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELC	essentielle Myosin-Leichtkette (essential light chain)
ET-1	Endothelin-1
ETHO	Ethanol
G	Guanin
ggf.	Gegebenenfalls
gp130	Glykoprotein 130
HCL	Salzsäure
HCM	Hypertrophe Cardiomyopathie
HNO ₃	Schwefelsäure
HOCM	Hypertrophe Obstruktive Cardiomyopathie
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (high pressure liquid chromatography)
IL-6	Interleukin-6
IL-11	Interleukin-11
JAK	Janus-aktivierte Kinase

kbp	Kilobasenpaare
KCL	Kaliumchlorid
kDA	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB-Medium	Luria-Bertrani-Medium
LIF	Leukemia inhibitory factor
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVMI	Linksventrikulärer Masseindex
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaCO ₃	Natriumbicarbonat
NFκB	Nuklearer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New-York-Heart-Association
OSM	Oncostatin M
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDH	Pyrovatdehydrogenase
PE	Phenylepinephrin
pmol	Picomol
RLC	regulatorische Myosin-Leichtkette (regulatory light chain)
RFLP-Analyse	Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleotid acid)

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
s.o.	siehe oben
SSCP	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (single strand conformation polymorphism)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TX	Transplantation
U	Einheit (unit)
u.a.	unter anderem
UTR	untranslatierte Region
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
W	Watt
WHO	Welt-Gesundheits-Organisation (world health organisation)

Literaturverzeichnis

- Akira, 1990:** Akira, S; Isshiki, H et al. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *Embo J.* 1990, *9* (6), 1897-906
- Aman, 1997:** Aman, M. J.; Leonard, W. J. Cytokine signaling: cytokine-inducible signaling inhibitors. *Curr Biol.* 1997, *7* (12), R784-8
- Asai, 2000:** Asai, S; Saito, Y; et al. The heart is a source of circulating cardiotrophin-1 in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, *279*(2), 320-3
- Baig, 1998:** Baig, M. K.; Goldman, J. H.; et al. Familial dilated cardiomyopathy: cardiac abnormalities are common in asymptomatic relatives and may represent early disease. *J Am Coll Cardiol.* 1998, *31*(1), 195-201
- Benigni, 1996:** Benigni, F; Sacco, S; et al. Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice in vitro in mouse blood cells. *Am J Pathol.* 1996, *149*, 1847-1850
- Betz, 1998:** Betz, U. A. K; Bloch, W; et al. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med.* 1998, *188*(10), 1955-65
- Birnboim, 1979:** Birnboim, H. C; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res.* 1979, *7*(6), 1513-23
- Blair, 2001:** Blair, E; Redwood, C; et al. Mutations in the gamma (2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 2001, *10*(11), 1215-1220
- Bowles, 1996:** Bowles, K. R; Gajarski, R; et al. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-23. *J Clin Invest.* 1996, *98*(6), 1355-60
- Braunwald, 1997:** Braunwald, E. Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine. W. B. Saunders Company, 1997
- Budowle, 1991:** Budowle, B; Chakraborty, R; et al. Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet.* 1991, *48*(1), 137-44
- Chandrasekar, 1996:** Chandrasekar, B; Melby, P. C; et al. Induction of proinflammatory cytokine expression in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, *223*(2), 365-71
- Chandrasekar, 1998:** Chandrasekar, B; Melby, P. C; et al. Overexpression of cardiotrophin-1 and gp130 during experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Immunol Lett.* 1998, *61*(2-3), 89-95
- Chen, 1999:** Chen, J; Chien, K. R. Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies. *J Clin Invest.* 1999, *103*(11), 1483-5
- Chevalier, 1996:** Chevalier, S; Fourcin, M; et al. Interleukin-6 family of cytokines induced activation of different functional sites expressed by gp130 transducing protein. *J Biol Chem.* 1996, *271*(25), 14764-72
- Ciapponi, 1995:** Ciapponi, L; Graziani, R; et al. Definition of a composite binding site for gp130 in human interleukin-6. *J Biol Chem.* 1995, *270*(52), 31249-54

- Codd, 1989:** Codd, MB; Sugrue, DD; et al. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy: a population based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984. *Circulation*. 1989, *80*(5), 64-572
- Colucci, 1996:** Colucci, W. S. Apoptosis in the heart (editorial comment). *N Engl J Med*. 1996, *335*(16), 1224-6
- Condie, 1993:** Condie, A; Eeles, R; et al. Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. *Hum Mut*. 1993, *2*(1), 58-66
- Cooper, 1984:** Cooper, D; Schmidtke, J. DNA restriction fragment length polymorphisms and heterozygosity in the human genome. *Hum Genet*. 1984, *66*(1), 1-16
- Courey, 1989:** Courey, A. J; Holtzman, D. A; et al. Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*. 1989, *59*(5), 827-36
- Craig, 2001:** Craig, R; Wagner, M; et al. The cytoprotective effects of the glycoprotein 130 receptor-coupled cytokine, cardiotrophin-1, require activation of NF-kappa B. *J Biol Chem*. 2001, *276*(40), 37621-9
- D'Adamo, 1997:** D'Adamo, P; Fassone, L; et al. The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *Am J Hum Genet*. 1997, *61*(4), 862-7
- de Meeus, 1995:** de Meeus, A. S. An isolated cardiac conduction disease maps to chromosome 19q. *Circ Res*. 1995, *77*, 35-740
- Durand, 1995:** Durand, J. B; Abchee, A. B; et al. Molecular and clinical aspects of inherited cardiomyopathies. *Ann Med*. 1995, *27*(3), 311-7
- Eiken, 1991:** Eiken, H. G; Odland, E; et al. Application of natural and amplification created restriction sites for the diagnosis of PKU mutations. *Nucleic Acids Res*. 1991, *19*(7), 1427-30
- Erdmann, 1998:** Erdmann, J; Hassfeld, S; et al. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human Cardiotrophin-1 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998, *244*, 494-497
- Erdmann, 2000:** Erdmann, J; Hassfeld, S; et al. Genetic variants in the promoter (g983G>T) and coding region (A92T) of the human cardiotrophin-1 gene (CTF1) in patients with dilated cardiomyopathy. *Hum Mut*. 2000, *16*(5), 448
- Evans, 1988:** Evans, T; Reitman, M; et al. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, *85*(16), 5976-80
- Fatkin, 1999:** Fatkin, D; MacRae, C; et al. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*. 1999, *341*(23), 1715-24
- Fentzke, 1998:** Fentzke, R. C; Korcarz, C. E; et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest*. 1998, *101*(11), 2415-26
- Franz, 1995:** Franz, W. M; Cremer M; et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Novel mutation of the dystrophin gene. *Ann N Y Acad Sci*. 1995, *752*, 470-91
- Freeman, 2001:** Freeman, K; Colon-Rivera, C; et al. Progression from hypertrophic to dilated cardiomyopathy in mice that express a mutant myosin transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001, *280*(1), H151-9

- Fuchs, 2000:** Fuchs, M; Drexler, H; et al. Pathophysiology of chronic heart failure. *Internist (Berl)*. 2000, *41(2 Pt1)*, 93-104
- Fukuzawa, 2000:** Fukuzawa, J; Booz, G. W; et al. Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3: An autocrine loop for hypertrophy. *Hypertension*. 2000, *35(6)*, 1191-6
- Funamoto, 2000a:** Funamoto, M; Fujio, Y; et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2000, *275(14)*, 10561-6
- Funamoto, 2000b:** Funamoto, M; Hishinuma, S; et al. Isolation and characterization of the Murine Cardiotrophin-1 Gene: Expression and Norepinephrine-Induced Transcriptional Activation. *J Moll Cell Cardiol*. 2000, *32(7)*, 1275-1284
- Garnier, 1978:** Garnier, J; Osguthorpe, DJ; Robson, B. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol*. 1978, *120(1)*, 97-120
- Gerull, 2002:** Gerull, B. G. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2002, *302*, 01-204
- Glavac, 1993:** Glavac, D; Dean, M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat*. 1993, *2(5)*, 404-14
- Grepin, 1994:** Grepin, C; Dagnino, L; et al. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol*. 1994, *14(5)*, 3115-29
- Grompe, 1993:** Grompe, M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genet*. 1993, *5(2)*, 111-7
- Grunig, 1998:** Grunig, E; Tasman, J. A; et al. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1998, *31(1)*, 186-94
- Haliassos, 1989:** Haliassos, A; Chomel, J. C; et al. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Res*. 1989, *17(9)*, 3606
- Hamanaka, 2000:** Hamanaka, I; Saito, Y; et al. Effects of cardiotrophin-1 on hemodynamics and endocrine function of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000, *279(1)*, H388-96
- Hefti, 1997:** Hefti, M. A; Harder, B. A; et al. Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1997, *29(11)*, 2873-92
- Hibi, 1996:** Hibi, M; Nakajima, K; et al. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med*. 1996, *74(1)*, 1-12
- Hirota, 1999:** Hirota, H; Chen, J; et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biochemical stress. *Cell*. 1999, *97(2)*, 189-98
- Hishinuma, 1999:** Hishinuma, S; Funamoto, M; et al. Hypoxic stress induces cardiotrophin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999, *264(2)*, 436-40
- Horvath, 1997:** Horvath, C. M; Darnell, J. E. The state of the STAT's: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Curr Opin Cell Biol*. 1997, *9(2)*, 233-9

- Huang, 1997:** Huang, W. Y; Liew, C. C. A conserved GATA motif in a tissue-specific DNase I hypersensitive site of the cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *Biochem J.* 1997, *325(Pt1)*, 47-51
- Hunter, 1995:** Hunter, J. J; Tanaka, N; et al. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1995, *270(39)*, 23173-8
- Ip, 1994:** Ip, H. S; Wilson, D. B; et al. The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol Cell Biol.* 1994, *14(11)*, 7517-26
- Ishikawa, 1999:** Ishikawa, M; Saito, Y; et al. A heart-specific increase in cardiotrophin-1 gene expression precedes the establishment of ventricular hypertrophy in genetically hypertensive rats. *J Hypertens.* 1999, *17(6)*, 807-16
- Jin, 1996:** Jin, H; Yang, R; et al. In vivo effects of cardiotrophin-1. *Cytokine.* 1996, *8(12)*, 920-6
- Jin, 1998:** Jin, H; Yang, R; et al. Effects of cardiotrophin-1 on haemodynamics and cardiac function in conscious rats. *Cytokine.* 1998, *10(1)*, 19-25
- Jougasaki, 2000:** Jougasaki, M; Tachibana, I; et al. Augmented cardiac cardiotrophin-1 in experimental congestive heart failure. *Circulation.* 2000, *101(1)*, 14-7
- Jung, 1999:** Jung, M; Poepping, I; et al. Investigation of a family with autosomal dominant dilated cardiomyopathy defines a novel locus on chromosome 2q14-q22. *Am J Hum Genet.* 1999, *65(4)*, 1068-77
- Kajstura, 1997:** Kajstura, J; Cigola, E; et al. Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, *29(3)*, 859-70
- Kamisago, 2000:** Kamisago, M; Sharma, S. D; et al. Mutations in Sarcomere Protein Genes as a Cause of Dilated Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2000, *343(23)*, 1688-1696
- Kass, 1994:** Kass, S; MacRae, C; et al. A gene defect that causes conduction system disease and dilated cardiomyopathy maps to chromosome 1p1-1q1. *Nature Genet.* 1994, *7(4)*, 546-51
- Kaye, 1992:** Kaye, M. The registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: ninth official report-1992. *J Heart Lung Transplant.* 1992, *11*, 599-606
- Kelly, 1994:** Kelly, D. P; Strauss, A. W. Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med.* 1994, *330(13)*, 913-9
- Kelly, 1997:** Kelly, R. A; Smith, T. W. Cytokines and cardiac contractile function (editorial). *Circulation.* 1997, *95(4)*, 778-81
- Kiowski, 1998:** Kiowski, W; Sutsch, G; et al. Endothelial control of vascular tone in chronic heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998, *32(Suppl 3)*, S67-73
- Knight, 1999:** Knight, J. C; Kwiatkowski, D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999, *111(4)*, 290-8
- Knippers, 1990:** Knippers, R. P; Schäfer, K. P; Fanning, E. *Molekulare Genetik*, 5. neubearb. u. erw. Auflage, Stuttgart; New York; Thieme, 1990
- Krajinovic, 1995:** Krajinovic, M; Pinamonti, B; et al. Linkage of familial dilated cardiomyopathy to chromosome 9. Heart Muscle Disease Study Group. *Am J Hum Genet.* 1995, *57(4)*, 846-52

- Kunisada, 2000:** Kunisada, K; Negoro, S; et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, *97(1)*, 315-9
- Kuo, 1997:** Kuo, C. T; Morrissey, E. E; et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 1997, *11(8)*, 1048-60
- Kuwahara, 1999:** Kuwahara, K; Saito, Y; et al.. Involvement of cardiotrophin-1 in cardiac myocyte-nonmyocyte interactions during hypertrophy of rat cardiac myocytes in vitro. *Circulation.* 1999, *100(10)*, S.1116-24,
- Kuwahara, 2000:** Kuwahara, K; Saito, Y; et al.. Cardiotrophin-1 phosphorylates akt and BAD, and prolongs cell survival via a PI3K-dependent pathway in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2000, *32(8)*, S.1385-94,
- Lankford, 1995:** Lankford, E. B; Epstein, N. D; et al.. Abnormal contractile properties of muscle fibers expressing beta-myosin heavy chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1995, *95(3)*, S.1409-14,
- Laverriere, 1994:** Laverriere, A. C; MacNeill, C; et al.. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem.* 1994, *269(37)*, S.23177-84,
- Levine, 1990:** Levine, B; Kalman, J; et al.. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* 1990, *323(4)*, S.236-41,
- Lewin, 2000:** Lewin, B. *Genes.* Oxford University press, 2000
- Li, 1999:** Li, D; Tapscoft, T; et al.. Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1999, *100(5)*, S.461-4,
- Liautard, 1997:** Liautard, J; Sun R. X; et al.. Specific inhibition of IL-6 signalling with monoclonal antibodies against the gp130 receptor. *Cytokine.* 1997, *9(4)*, S.233-41,
- Maisch, 1998:** Maisch, B. Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force-more questions than answers?. *Med Klin.* 1998, *93(4)*, S.199-209,
- Maron, 1995:** Maron, BJ; Gardin, MJ; et al.. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. *Circulation.* 1995, *92*, S.785-789,
- Mathur, 1999:** Mathur, A; Sims, H. F; et al.. Molecular heterogeneity in very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing pediatric cardiomyopathy and sudden death. *Circulation.* 1999, *99(10)*, S.1337-43,
- Matsui, 1999:** Matsui, H; Ihara, Y; et al.. Induction of interleukin (IL)-6 by hypoxia is mediated by nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL6 in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 1999, *42(1)*, S.104-12,
- Matsumori, 1994:** Matsumori, A; Yamada, T; et al.. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* 1994, *72(6)*, S.561-6,
- Messina, 1997:** Messina, D. N; Speer, M. C; et al.. Linkage of familial dilated cardiomyopathy with conduction defect and muscular dystrophy to chromosome 6q23. *Am J Hum Genet.* 1997, *61(4)*, S.909-17,
- Mestroni, 1990:** Mestroni, L; Miani, D; et al.. Clinical and pathologic study of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1990, *65(22)*, S.1449-53,

- Michels, 1992:** Michels, V. V; Moll, P. P; et al.. The frequency of familial dilated cardiomyopathy in a series of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1992, *326*(2), S.77-82,
- Middleton, 2000:** Middleton, G; Hamanoue, M; et al.. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol.* 2000, *148*(2), S.325-32,
- Mogensen, 1999:** Mogensen, J; Klausen, I. C; et al.. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 1999, *103*(10), S.R39-43,
- Mogensen, 2003:** Mogensen, J; Kubo, T. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutation. *J Clin Invest.* 2003, *111*, S.209-216,
- Molvig, 1988:** Molvig, J; Baek, L; et al.. Endotoxin-stimulated human monocyte secretion of interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. *Scand J Immunol.* 1988, *27*(6), S.705-16,
- Mosley, 1996:** Mosley, B; De Imus, C; et al.. Dual Oncostatin M (OSM) Receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring osm-specific receptor activation. *J Biol Chem.* 1996, *271*(50), S.32635-43,
- Muesch, 1990:** Muesch, A; Hartmann, E; et al.. A novel pathway for secretory proteins?. *Trends Biochem Sci.* 1990, *15*(3), S.86-8,
- Munger, 1996:** Munger, M. A.; Johnson, B; et al.. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 1996, *77*(9), S.723-7,
- Narula, 1996:** Narula, J; Haider, N; et al.. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med.* 1996, *335*(16), S.1182-9,
- Nathan, 1991:** Nathan, C; Sporn, M. Cytokines in context. *J Cell Biol.* 1991, *113*(5), S.981-6,
- Negoro, 2000:** Negoro, S; Kunisada, K; et al.. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2000, *47*(4), S.797-805,
- Neumann, 1982:** Neumann, E; Schaefer-Ridder, M; et al.. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J.* 1982, *1*(7), S.841-5,
- Olivetti, 1997:** Olivetti, G; Abbi, R; et al.. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med.* 1997, *336*(16), S.1131-41,
- Olson, 1996:** Olson, T. M; Keating, M. T. Mapping a cardiomyopathy locus to chromosome 3p22-p25. *J Clin Invest.* 1996, *97*(2), S.528-32,
- Olson, 1998:** Olson, T. M; Michels, V. V; et al.. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science.* 1998, *280*(5364), S.750-2,
- Olson, 2001:** Olson, T. M; Kishimoto, N. Y; et al.. Mutations that alter the surface charge of alpha-tropomyosin are associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2001, *33*(4), S.723-732,
- Orita, 1989:** Orita, M; Suzuki, Y; et al.. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989, *5*(4), S.874-9,

- Pan, 1998:** Pan, J; Fukuda, K; et al.. Involvement of gp130-mediated signaling in pressure overload-induced activation of the JAK/STAT pathway in rodent heart. *Heart Vessels*. 1998, *13*(4), S.199-208,
- Pan, 1999:** Pan, J; Fukuda, K; et al.. Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res*. 1999, *84*(10), S.1127-36,
- Passarge, 1994:** Passarge, E. Taschenbuch der Genetik. Stuttgart, New York, Thieme, 1994
- Patel, 2000:** Patel, R; Lim, D. S; et al.. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2000, *32*(12), S.2369-77,
- Pennica, 1995a:** Pennica, D; King, K. L; et al.. Expression cloning of cardiotrophin-1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, *92*(4), S.1142-6,
- Pennica, 1995b:** Pennica, D; Shaw, K. J; et al.. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem*. 1995, *270*(18), S.10915-22,
- Pennica, 1996a:** Pennica, D; Arce, V; et al.. Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*. 1996, *17*(1), S.63-74,
- Pennica, 1996b:** Pennica, D; Swanson, T. A; et al.. Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine*. 1996, *8*(3), S.183-9,
- Peters, 1995:** Peters, M; Roeb, M; et al.. A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1). *FEBS Lett*. 1995, *372*(2-3), S.177-80,
- Reed, 1974:** Reed, L. J. Multienzyme complexes. *Acc. Chem. Res.*. 1974, *7*, S.40-46,
- Richards, 1996:** Richards, C. D; Langdon, C; et al.. Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells. *J Interferon and Cytokine Res*. 1996, *16*, S.69-75,
- Richards, 2000:** Richards, C. D; Langdon, C; et al.. Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin m, leukemia inhibitory factor, CARDIOTROPHIN-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine*. 2000, *12*(6), S.613-21,
- Richardson, 1996:** Richardson, P; McKenna, W; et al.. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*. 1996, *93*(5), S.841-2,
- Risch, 1996:** Risch, N; Merikangas, K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996, *273*(5281), S.1516-7,
- Robinson, 1994:** Robinson, R. C; Grey, L. M; et al.. The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implication for receptor binding. *Cell*. 1994, *77*(7), S.1101-16,
- Robledo, 1997:** Robledo, O; Fourcin, M; et al.. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem*. 1997, *272*(8), S.4855-63,
- Rolfs, 1992:** Rolfs, A. S. PCR: clinical diagnostics and research. Berlin, Springer Verlag, 1992
- Saiki, 1986:** Saiki, RK; Bugawan, TL; et al.. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA_DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*. 1986, *324*(6093), S.163-166,

- Sakamoto, 1997:** Sakamoto, A; Ono, K; et al.. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted Dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997, *94*(25), S.13873-8,
- Sanger, 1977:** Sanger, F; Nicklen, S; et al.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977, *74*(12), S.5463-7,
- Sano, 2000:** Sano, M; Fukuda, K; et al.. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2000,
- Saraste, 1997:** Saraste, A; Pulkki, K; et al.. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*. 1997, *95*(2), S.320-3,
- Schonberger, 2000:** Schonberger, J; Levy, H; et al.. Dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss: a heritable syndrome that maps to 6q23-24 . *Circulation*. 2000, *101*(15), S.1812-8,
- Sheng, 1996:** Sheng, Z; Pennica, D; et al.. Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival. *Development*. 1996, *122*(2), S.419-28,
- Sheng, 1997:** Sheng, Z; Knowlton, K; et al.. Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 1997, *272*(9), S.5783-91,
- Shuman, 1994:** Shuman, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem*. 1994, *269*(51), S.32678-84,
- Simpson, 1997:** Simpson, R. J; Hammacher, A; et al.. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci*. 1997, *6*(5), S.929-55,
- Siu, 1999:** Siu, B. L; Niimura, H; et al.. Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31. *Circulation*. 1999, *99*(8), S.1022-6,
- Solway, 1998:** Solway, J; Forsythe, S. M; et al.. Transcriptional regulation of smooth muscle contractile apparatus expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998, *158*(5 Pt 3), S.S100-8,
- Stephanou, 1998:** Stephanou, A; Brar, B; et al.. Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli. *J Mol Cell Cardiol*. 1998, *30*(4), S.849-55,
- Sugrue, 1992:** Sugrue, D. D; Rodeheffer, R. J; et al.. The clinical course of idiopathic dilated cardiomyopathy. A population based study. *Ann Intern Med*. 1992, *117*(2), S.117-23,
- Suomalainen, 1992:** Suomalainen, A; Paetau, A; et al.. Inherited idiopathic dilated cardiomyopathy with multiple deletions of mitochondrial DNA. *Lancet*. 1992, *340*(8831), S.1319-20,
- Sylvius, 2001:** Sylvius, N; Tesson, F; et al.. A new locus for autosomal dominant dilated cardiomyopathy identified on chromosome 6q12-q16. *Am J Hum Genet*. 2001, *68*(1), S.241-246,
- Taga, 1997:** Taga, T; Kishimoto, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997, *15*, S.797-819,
- Talwar, 1999:** Talwar, S; Downie, P. F; et al.. An immunoluminometric assay for cardiotrophin-1: a newly identified cytokine is present in normal human plasma and is increased in heart failure. *Biochem Biophys*

- Res Commun. 1999, 261(3), S.567-71,
- Talwar, 2000:** Talwar, S; Squire, I. B; et al. . Elevated circulating cardiotrophin-1 in heart failure: Relationship with parameters of left ventricular systolic dysfunction. Clin Sci (Colch). 2000, 99(1), S.83-88,
- Timmermann, 2000:** Timmermann, A; Pflanz, S; et al.. Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor. FEBS Lett. 2000, 468(2-3), S.120-4,
- Touw, 2000:** Touw, I. P; De Koning, J. P; et al.. Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. Mol Cell Endocrinol. 2000, 160(1-2), S.1-9,
- Tsubata, 2000:** Tsubata, S; Bowles, K. R; et al.. Mutations in the delta-sarcoglycan gene familial and sporadic dilated cardiomyopathy. J Clin Invest. 2000, 106(5), S.655-662,
- Ungerer, 1993:** Ungerer, M; Bohm, M; et al.. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. Circulation. 1993, 87(2), S.454-63,
- Vanderheyden, 1998:** Vanderheyden, M; Kersschot, E; et al.. Pro-inflammatory cytokines and endothelium-dependent vasodilation in the forearm. Serial assessment in patients with congestive heart failure. Eur Heart J. 1998, 19(5), S.747-52,
- Vergeer, 2000:** Vergeer, W. P; Sogo, J. M; et al.. Interaction of AP1, AP2, and SP1 with the regulatory regions of the human pro-alpha1(I) collagen gene. Arch Biochem Biophys. 2000, 377(1), S.69-79,
- Vosberg, 1998:** Vosberg, H. P. Genetic causes of hypertrophic cardiomyopathy. Med Klin. 1998, 93(4), S.252-9,
- Wallrath; 1994:** Wallrath, L. L; Lu, Q; et al.. Architectural variations of the inducible eukaryotic promoters: preset and remodeling chromatin structures. Bioessays. 1994, 16(3), S.165-70,
- Walton, 1990:** Walton, K. M; Reh fuss, R. P. Molecular mechanisms of cAMP-regulated gene expression. Mol Neurobiol. 1990, 4(3-4), S.197-210,
- Wegner, 2000:** Wegner, M. Transcriptional control in myelinating glia: flavors and spices. Glia. 2000, 31(1), S.1-14,
- Westendorp, 1997:** Westendorp, R. G; Langermans, J. A; et al.. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. Lancet. 1997, 349(9046), S.170-3,
- Wijdenes, 1995:** Wijdenes, J; Heinrich, P. C; et al.. Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies. Eur J Immunol. 1995, 25(12), S.3474-81,
- Wingender, 1997:** Wingender, E; Kel, A. E; et al.. TRANSFAC, TRRD and COMPEL: towards a federated database system on transcriptional regulation. Nucleic Acids Res. 1997, 25(1), S.265-8,
- Wollert, 1996:** Wollert, K. C; Taga, T; et al.. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series via gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. J Biol Chem. 1996, 271(16), S.9535-45,
- Wollert, 1997:** Wollert, K. C; Chien, K. R. Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development. J Mol Med. 1997, 75, S.492-501,
- Wu, 1997:** Wu, C. F; Bishopric, N. H; et al.. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac

myocytes. J Biol Chem. 1997, 272(23), S.14860-6,

Yoshida, 1996: Yoshida, K; Taga, T; et al.. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93(1), S.407-11,

Zelis, 1982: Zelis, R; Flaim, S. F. Alterations in vasomotor tone in congestive heart failure. Prog Cardiovasc Dis. 1982, 24(6), S.437-59,

Zolk, 2002: Zolk, O; Leong, L; et al.. Augmented expression of cardiotrophin-1 in failing human hearts is accompanied by diminished glycoprotein 130 receptor protein abundance. Circulation. 2002, 106, S.1442-1446,

ABSTRAKT	0
ABSTRACT	0
1 EINLEITUNG	1
1.1 KARDIOMYOPATHIEN	2
1.1.1 WHO/ISFC-KLASSIFIKATION	2
1.1.2 DILATATIVE KARDIOMYOPATHIE	3
1.1.3 HYPERTROPHE KARDIOMYOPATHIE	5
1.2 CARDIOTROPHIN-1 UND DIE INTERLEUKIN-6-FAMILIE	7
1.2.1 PROTEIN- UND GENSTRUKTUR, CHROMOSOMENLOKALISATION UND EINORDNUNG VON CARDIOTROPHIN-1	7
1.2.2 EXPRESSIONSMUSTER VON CARDIOTROPHIN-1	8
1.2.3 REZEPTORSYSTEME UND SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE DER INTERLEUKIN-6-FAMILIE	9
1.2.4 KARDIALE WIRKUNGEN VON CARDIOTROPHIN-1	12
1.2.5 WIRKUNGEN AUF EXTRAKARDIALE GEWEBE	15
1.3 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 MATERIALIEN	17
2.1.1 GERÄTE	17
2.1.2 CHEMIKALIEN	18
2.1.3 KOMPLETTE KITS	18
2.1.4 PATIENTENKOLLEKTIV FÜR DAS MUTATIONSSCREENING IN DER KODIERENDEN REGION UND IM PROMOTOR	19
2.1.5 PATIENTENKOLLEKTIV FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG DER CARDIOTROPHIN-1 mRNA	20
2.1.6 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	24
2.2 METHODEN	25
2.2.1 ÜBERBLICK	25
2.2.2 KLONIERUNG UND SEQUENZIERUNG DER 5'-UNTRANSLATIERTEN REGION	26
2.2.3 FUNKTIONSANALYSE DER 5'-UNTRANSLATIERTEN REGION	26
2.2.4 VARIANTENSUCHE IN DER KODIERENDEN UND 5'-UNTRANSLATIERTEN REGION DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1 GENS	31
2.2.5 QUANTIFIZIERUNG DER mRNA DES HUMANEN CT-1- GENS IN MYOKARDBIOPSIEN	42
3 ERGEBNISSE	48

3.1	CHARAKTERISIERUNG DER 5'-UNTRANSLATIERTEN REGION DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1 GENS	48
3.1.1	SEQUENZ DES 1113 BP LANGEN 5'-FLANKIERENDEN BEREICHS DES HUMANEN CT-1 GENS UND MÖGLICHE TRANSKRIPTIONSFAKTOR-BINDUNGSSTELLEN	48
3.2	PROMOTOR-AKTIVITÄT DER 5'-UNTRANSLATIERTEN REGION DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1 GENS	51
3.3	VARIANTEN IN DER KODIERENDEN REGION DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1 GENS	53
3.3.1	VARIANTE AN DER POSITION +274 IM CODON 92	53
3.4	VARIANTEN INNERHALB DER 5'-FLANKIERENDEN REGION DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1 GENS	55
3.4.1	POLYMORPHISMUS AN DER POSITION -130	56
3.4.2	VARIANTE AN DEN POSITIONEN -992 BIS -995	61
3.5	CT-1 mRNA-EXPRESSION IN MENSCHLICHEM MYOKARDGEWEBE	62
3.5.1	CT-1 mRNA QUANTIFIZIERUNG	62
3.5.2	KORRELATION DER CT-1 mRNA EXPRESSION MIT DER LINKSVENTRIKULÄREN FUNKTION	65
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>69</u>
4.1	DIE 5'-UNTRANSLATIERTE REGION DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1-GENS	69
4.1.1	SEQUENZANALYSE: KONSENSUSSEQUENZEN FÜR TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	69
4.1.2	DIE REGULATORISCHE FUNKTION DES PROMOTORS DES HUMANEN CT-1-GENS	73
4.2	GENETISCHE VARIABILITÄT IM KODIERENDEN UND REGULATORISCHEN BEREICH DES HUMANEN CARDIOTROPHIN-1-GENS UND IHRE MÖGLICHE BEDEUTUNG IN DER ÄTIOLOGIE VON KARDIOMYOPATHIEN	75
4.2.1	DIE MÖGLICHE FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DES AMINOSÄUREAUSTAUSCHES IM CODON 92	77
4.2.2	POLYMORPHISMUS IM PROMOTOR AN DER POSITION -130	81
4.2.3	DELETION AN DEN POSITIONEN -992 BIS -995 DER PROMOTORREGION	83
4.3	VERÄNDERUNG DES CT-1 mRNA GEHALTES IM MENSCHLICHEN MYOKARD BEI PATIENTEN MIT CHRONISCHER HERZINSUFFIZIENZ	85
4.3.1	NUTZUNG VON PDH ALS REFERENZGEN	85
4.3.2	MÖGLICHE BEDEUTUNG DER CT-1-INDUKTION IM INSUFFIZIENTEN MYOKARD	86
4.3.3	LIMITATIONEN DER UNTERSUCHUNG	90
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>91</u>
6	<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>94</u>
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>98</u>